

M1
Tesis/
2895

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

*Modulación de la neurogénesis y de la conducta
por hormonas tiroideas en ratas adultas*

TESIS DOCTORAL

Reg. F.M. 26.030

Ana Montero Pedrazuela
Madrid, 2006

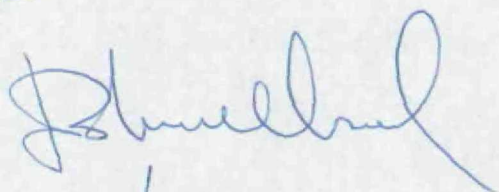


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA MADRID
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 N°. 200600007006
16/05/06 10:45:45

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de SOBRESALIENTE "CON LAUDE"

Madrid, 23 DE JUNIO 2006



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

*Modulación de la neurogénesis y de la conducta
por hormonas tiroideas en ratas adultas*

Memoria que presenta la licenciada en Ciencias Biológicas
Ana Montero Pedrazuela para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directora: Dra. Ana Cristina Guadaño Ferraz
Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM

Madrid 2006



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
"ALBERTO SOLS"

Ana Cristina Guadaño Ferraz, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Contratada Ramón y Cajal en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM),

CERTIFICA: que **Ana Montero Pedrazuela**, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado:

**Modulación de la neurogénesis y de la conducta
por hormonas tiroideas en ratas adultas**

y considera que el trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expide el presente certificado en Madrid a 9 de Mayo de 2006.

Fdo. Dra. Ana Cristina Guadaño Ferraz
Directora de la tesis

Esta tesis ha podido llevarse a cabo gracias a la
financiación del Ministerio de Educación y Ciencia
(antes Ministerio de Ciencia y Tecnología;
BFI2001-2412 y BFU2004-05944).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar un abrazo fuerte, fuerte a Ana, por confiar en mí y ofrecerme la posibilidad de hacer la tesis cuando ya lo daba todo por perdido. ¡Si fuera por como empezamos! Eres una persona accesible y nos hemos entendido muy bien (muchas veces tú en tu papel de madraza). Gracias por todo lo que me has enseñado y lo que hemos compartido estos años.

Quiero agradecer a Juan su acogimiento en el laboratorio, primero como cursillista y después como becaria de Ana, y como no podría ser de otra manera en la tradición de su laboratorio, porque ¡en el 2.10 cabemos todos! Y hablando del 2.10, la verdad es que he tenido mucha suerte, porque habrá pocos laboratorios con gente tan dispar y tan buen rollo entre todos. Mucha culpa de todo la tiene Jimena, con su ánimo arrollador y su disposición a ayudar y enseñar a todo el mundo. De todas formas he aprendido de toda la gente del labo: MariCarmen (últimamente el mejor apoyo), Diego (informático y estadístico), Bea, Marina (muchos experimentos compartidos), Lali y toda la gente que ha pasado durante estos años por el labo. Un saludito especial para mi compi Iván.

A toda la gente del IIB de la que he aprendido y con la que he compartido las horas de laboratorio (y de sala de personal) durante este tiempo: gracias. Últimamente y por afinidad de situación a Sandra (vuela, pajarillo!!) y Marina (ya queda menos...). Carlos Quijano (por los apoyos finales) y la gente de su labo, los Migueles y Susana, por su simpatía. A la gente que fue del 2.11: Jose, Itziar, Yoko, Yoli y Patricia, a todos los del 2.9 (en especial a Isa), a María Jesús Obregón y su gente (Rosa siempre dando ánimos). Por último y con un cariño muy especial un abrazo a Rosalía (me has enseñado mucho), María Jesús, Elena y Soco (la de guerra que os he dado) y por supuesto a Paco y Gabriella (os agradezco todo vuestro apoyo de corazón y por supuesto esta última temporada de padres científicos de acogida).

No se me olvida la gente de servicios, que con su trabajo de hormiguita hacen que todo funcione... Los chicos de informática, siempre tan atareados y dispuestos a echar un cable. Guti (cuídate muchacho!!), Nani (nos ayudas hasta con las lesiones), Merino (el buen rollo personificado, un poco besucón pero le perdonamos por majete) y las nuevas adquisiciones, Curro y Gonzalo. Los chicos de imagen: Antonio (el fotógrafo oficial del Instituto), Ricardo (santa paciencia es la que tienes) y como no Javier (¡qué grande eres con el Illustrator!). También quiero dar las gracias a toda la gente del animalario: Fernando, Pablo, Saleta, Helena y Ángel, por vuestro trabajo con mis ratitas y ratones y por las ayudas, consejos y charlas. Y como no, a los chicos de Carmina: David, Manolo, Miguel y Santi (estos sí que se lo montan bien).

En la facultad, gracias a Carlos Avendaño por todas las dudas resueltas y por su paciencia al explicármelas. Gracias a Estrella por todo: su curso fue el inicio de esta etapa.

Ya más lejos, tengo que dar las gracias a César por sus enseñanzas sobre los estudios de comportamiento y estadística. En Valencia, gracias a todas las chicas de laboratorio de Verdugo: Almudena, Sara, Clara, Melisa y Pilar (sois las mejores), y como no a Mario (el as de la microscopía electrónica) y por supuesto a Esther. José Manuel, me has enseñado muchas cosas y a ver algunas con otro punto de vista.

Y por fin llego a la gente más cercana, mi familia. Aunque con altibajos (ya sé que os preocupa mucho mi alergia, pero creo que terminaré controlándola), siempre me he sentido apoyada en todo. Papá que sí, que ya termino (¿y ahora qué?). Mamá: una nueva etapa...en todos los sentidos. Un besazo a toda la familia de Carbonero el Mayor y de Aguadulce, en especial a mi abuela y todos mis tíos, titos y primos.

Por supuesto, quiero dar la gracias por las horas de fuera del curro a todos mis amigos (aunque se que os tengo un pelín abandonados). A Javichu (por estar ahí), a Pepe (cuídate más, desastre), a Suco (siempre en contacto, aunque pase mucho tiempo), a Lucas (quedamos pronto, como siempre, eh?), a Ana (mi flautista emigrada: prometo pronta visita) y claro, a Carlos (tenemos que seguir en contacto, pero más a eh?). También agradecimientos para Tato (Bea: ¿te has dado cuenta de que es un desastre? pero le queremos!!), a Ilia (cada vez más fashion, estos artistas...), a Lobato (contigo sí se puede hablar de ciencia, hombre), a Juan Luis. Si se me olvida alguien que me perdone, que el estrés es malísimo para la memoria. Un abrazo especial para Nacho (culo inquieto, como buen gallego). A partir de ahora a ver si nos vemos más, chavales.

Y más que a nadie (y que nadie se ofenda), gracias Rubén. Cada día aprendo contigo, desde la teoría de las supercuerdas, o el cenit del petróleo, a como ser mejor persona. Suerte la mía de tenerte cerca cada día (y a partir de ahora espero que más). Gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
 INTRODUCCIÓN	 1
1. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	1
1.1 Síntesis, secreción y transporte de las hormonas tiroideas	1
1.2. Metabolismo de las hormonas tiroideas	2
1.3. Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas	3
1.3.1 Modulación de la expresión génica	3
1.3.2. Mecanismos de acción extranucleares de las hormonas tiroideas	5
1.4. Acciones de las hormonas tiroideas en el sistema nervioso: hipotiroidismo	6
1.4.1. El hipotiroidismo durante el desarrollo del sistema nervioso	6
1.4.2. El hipotiroidismo en el sistema nervioso adulto	8
2. LA FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO	11
2.1 Anatomía del giro dentado en la rata adulta	11
2.2 Anatomía del hipocampo en la rata adulta	12
2.3. Conexiones de la formación del hipocampo	12
2.4 Funciones de la formación del hipocampo	14
2.4.1 Adquisición y consolidación de memorias	14
2.4.2 Mantenimiento del estado de ánimo	15
3. NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO	16
3.1 Zonas neurogénicas en el cerebro de la rata adulta	17
3.1.1 La zona subventricular de los ventrículos laterales	17
3.1.2 La zona subgranular del giro dentado	18
3.2 Factores moduladores de la neurogénesis en el adulto	20
3.3 Funciones de la neurogénesis en el cerebro adulto	21

OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	24
1.1 Hipotiroidismo.....	25
1.2. Tratamiento con hormonas tiroideas.....	26
1.2.1 Tratamiento crónico.....	26
1.2.2. Tratamientos agudos	26
1.3. Inyecciones de BrdU	27
1.3.1. Estudios de proliferación celular.....	27
1.3.2. Estudios de supervivencia de las células generadas <i>de novo</i>	27
1.4. Sacrificio de los animales y obtención del tejido.....	28
2. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS	29
2.1 Determinación de las concentraciones de hormonas tiroideas.....	29
2.1.1. Síntesis de trazadores (T4 y T3 marcadas radiactivamente)	29
2.1.2. Extracción de hormonas tiroideas de plasma e hígado.....	29
2.1.3. Determinación de T3 y T4 en extractos de plasma e hígado (RIA).....	30
2.2 Determinación de la concentración de corticosterona en plasma.....	30
2.3. Análisis del ARN mensajero de desyodasa 1 en hígado (northern blot)	31
3. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA.....	32
3.1 Obtención del tejido.....	32
3.2 Procedimiento	32
3.2.1 Inmunohistoquímica	32
3.2.2 Inmunofluorescencia.....	33
3.3 Anticuerpos utilizados	33
3.4 Método TUNEL.....	34
3.5 Análisis cuantitativo de células inmunopositivas	34

4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	35
4.1 Inclusión del tejido y obtención de secciones	35
5. TINCIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO MEDIANTE TÉCNICA DE NISSL.....	36
5.1 Secciones de vibratomo	36
5.2 Secciones semifinas	36
6. ANÁLISIS DE LA ANATOMÍA Y CITOARQUITECTURA DEL GIRO DENTADO	37
6.1 Anatomía del giro dentado.....	37
6.2 Citoarquitectura del giro dentado.....	37
6.3 Volumen del giro dentado.....	37
7. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO.....	38
7.1 Prueba de nado forzado.....	38
7.1.1 Desarrollo de la prueba.....	38
7.1.2 Evaluación del comportamiento de tipo depresivo.....	39
7.2 Reconocimiento de un objeto nuevo.....	39
7.2.1 Desarrollo de la tarea	39
7.2.2 Evaluación de la actividad exploratoria.....	40
7.3 Pruebas de condicionamiento por miedo	40
7.3.1 Instrumentación.....	41
7.3.2 Condicionamiento	41
7.3.3 Evaluación del condicionamiento por miedo al contexto.....	42
7.3.4 Evaluación del condicionamiento por miedo al sonido	42
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	43
RESULTADOS	45
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	44
1.1 Estudio del estado tiroideo	44
1.1.1 Peso corporal final y ganancia de peso.....	44

1.1.2. Concentraciones de hormonas tiroideas	45
1.1.3. Desyodasa 1 hepática	45
1.2. Concentraciones plasmáticas de corticosterona.....	46
2. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN EL GIRO DENTADO.....	47
2.1 Análisis de la capacidad proliferativa en la zona subgranular	47
2.1.1. Proliferación celular: grupo P95	47
2.1.2. Proliferación celular: grupo P120	48
2.1.3. Análisis de las unidades proliferativas	49
2.2 Análisis de las neuronas generadas <i>de novo</i>	50
2.2.1. Generación de neuroblastos y maduración neuronal: grupo P95	50
2.2.2. Generación de neuroblastos y maduración neuronal: grupo P120	51
2.3. Análisis comparativo de la neurogénesis en las dos edades estudiadas: P95 y P120 .	53
2.4 Análisis de la muerte celular.....	54
2.5 Supervivencia de las células generadas	54
2.5.1. Supervivencia de las células generadas en la ZSG: protocolo 1	55
2.5.2. Supervivencia de las células generadas en la ZSG: protocolo 2	55
2.6 Organización del giro dentado del hipocampo en los distintos estados tiroideos.....	56
2.6.1. Estudio de la anatomía y citoarquitectura del giro dentado	56
2.6.2. Estudio de la ultraestructura del giro dentado	58
3. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN EL COMPORTAMIENTO	58
3.1 Prueba de nado forzado.....	58
3.1.1 Hipotiroidismo y reemplazo hormonal.....	58
3.1.2 Tratamiento agudo con hormonas tiroideas.....	60
3.2 Reconocimiento de un objeto nuevo.....	61
3.3 Pruebas de condicionamiento por miedo	63
DISCUSIÓN	65
1. HORMONAS TIROIDEAS Y NEUROGÉNESIS	66

1.1 Proliferación en el giro dentado	66
1.2. Generación de nuevas neuronas en el giro dentado.....	69
1.3 Supervivencia de las nuevas células generadas	71
1.4. Anatomía y ultraestructura del giro dentado	72
2. HORMONAS TIROIDEAS Y COMPORTAMIENTO	73
2.1 Comportamiento de tipo depresivo.....	73
2.2 Aprendizaje y memoria.....	75
2.2.1. Reconocimiento de un objeto nuevo.....	75
2.2.2. Condicionamiento por miedo.....	76
3. REPERCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS	77
 CONCLUSIONES.....	 78
 BIBLIOGRAFÍA.....	 80
 ANEXO I. PUBLICACIONES RELACIONADAS	 99
 Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior Mol Psychiatry. 2006 Apr;11(4):361-71.	
Ana Montero-Pedrazuela, César Venero, Rosalía Lavado-Autric, Ivan Fernández-Lamo, José Manuel García-Verdugo, Juan Bernal y Ana Guadaño-Ferraz.....	99
 ANEXO II. OTRAS PUBLICACIONES.....	 110
 Divergent expression of type 2 deiodinase and the putative thyroxine-binding protein p29, in rat brain, suggests that they are functionally unrelated proteins. Endocrinology. 2003 Mar;144(3):1045-52.	
Ana Montero-Pedrazuela, Juan Bernal y Ana Guadaño-Ferraz	110

Generation and characterization of dickkopf3 mutant mice. Mol Cell Biol. 2006 Mar;26(6):2317-26.

Iván del Barco Barrantes, Ana Montero-Pedrazuela, Ana Guadaño-Ferraz, María Jesús Obregón, Raquel Martínez de Mena, Valérie Gailus-Durner, Helmut Fuchs, Tobias J. Franz, Svetoslav Kalaydjiev, Martina Klempt, Sabine Hölter, Birgit Rathkolb, Claudia Reinhard, Gabriella Morreale de Escobar, Juan Bernal, Dirk H. Busch, Wolfgang Wurst, Eckhard Wolf, Holger Schulz, Svetlana Shtrom, Erich Greiner, Martin Hrabe de Angelis, Heiner Westphal y Christof Niehrs 118

ABREVIATURAS

+	Células inmunopositivas
ANOVA	Análisis de varianza
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Bovine serum albumin (seroalbúmina bovina)
CA	Cornu Ammonis, asta de Amón
CMR	Camino migrador rostral
cols.	Colaboradores
cpm	Cuentas por minuto
D1, D2, D3	Desyodasas tipo 1, 2 y 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DCX	Doublecortin (Doblecortina)
E	Grupo de animales eutiroideos
GD	Giro dentado
H	Grupo de animales hipotiroideos
HT	Hormonas tiroideas
I	Grupo de animales con tratamiento agudo inyectado
i.p.	Intraperitoneal
LTP	Long term potentiation (potenciación a largo plazo)
P	Día postnatal (P95, P120,...)
PB	Phosphate buffer (tampón fosfato)
PB-azida	PB 0,1M con azida al 0,05%
PBS	Phosphate buffer saline (tampón fosfato salino)
R	Grupo de animales con reemplazo hormonal
RIA	Radioinmunoanálisis
rT3	3,5,5'-triyodo-L-tironina o T3 reversa
RXR	Receptor del ácido 9-cis-retinoico
SDS	Sodium dodecyl sulphate (dodecilsulfato sódico)
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
T2	3,5-diyodo-L-tironina
T3	3,5,3'-triyodo-L-tironina
T4	Tiroxina o 3,5,3',5'-tetrayodo-L-tironina
TR	Thyroid receptor (receptor de hormonas tiroideas)
TRE	Thyroid hormone response element (elemento de respuesta a HT)
TRH	Thyrotrophin releasing hormone (hormona liberadora de tirotropina)
TSH	Thyroid-stimulating hormone (hormona estimuladora del tiroides)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
VL	Ventrículo lateral
W	Grupo de animales con tratamiento agudo en el agua de bebida
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

RESUMEN

Las alteraciones hormonales están implicadas en muchas patologías asociadas con la edad como las enfermedades neurodegenerativas y los trastornos psiquiátricos. En el adulto, las alteraciones del estado tiroideo cursan con frecuencia con cambios psicológicos y trastornos del estado del ánimo como la depresión. Se ha demostrado que en los mamíferos adultos, incluido el hombre, continúan generándose neuronas a partir de células madre en el giro dentado (GD) de la formación del hipocampo. Las neuronas generadas se integran funcionalmente y podrían estar implicadas en procesos de memoria y aprendizaje, así como en el mantenimiento del estado de ánimo. Se ha descrito que una disminución de la neurogénesis adulta induce trastornos depresivos y que la eficacia de los antidepresivos depende de la generación de nuevas neuronas en el GD. Por ello, el conocimiento del proceso de adquisición de nuevas neuronas en el adulto y su modulación puede suponer una herramienta importante para paliar daños cerebrales y enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas. Numerosos estudios han demostrado que las hormonas tiroideas (HT) son esenciales para la neurogénesis y la gliogénesis durante el desarrollo, pero hay muy pocos trabajos que hayan analizado su función en el adulto.

El objetivo de esta tesis fue analizar *in vivo* la posible modulación de la neurogénesis adulta en el GD por las HT, así como explorar posibles implicaciones funcionales relacionadas con esta modulación. Los resultados obtenidos indican que el hipotiroidismo adulto durante un corto periodo de tiempo disminuye significativamente la capacidad proliferativa del GD, reduciendo tanto el número de precursores neuronales en proliferación, como el número de unidades proliferativas. Además, el hipotiroidismo afecta gravemente a los neuroblastos inmaduros disminuyendo su número, alterando su distribución y provocando un desarrollo anormal de su árbol dendrítico. Estos cambios en la neurogénesis afectan algunas funciones dependientes del hipocampo. Los animales hipotiroideos muestran un mayor comportamiento de tipo depresivo que los eutiroideos en un modelo experimental de depresión (prueba de nado forzado). El tratamiento crónico de las ratas hipotiroideas con HT fue capaz de recuperar la tasa de neurogénesis en el GD y normalizar el comportamiento de estos animales.

Nuestros resultados indican que las HT son esenciales para la neurogénesis adulta en el GD y sugieren que los desórdenes del comportamiento depresivo provocados por el hipotiroidismo adulto en humanos pueden estar relacionados, entre otros, con la disminución de la neurogénesis en el GD. Todo lo anterior podría ser importante para futuras aplicaciones terapéuticas en la modulación de la neurogénesis endógena y desórdenes del comportamiento.

SUMMARY

Hormonal imbalances are involved in many of the age-related pathologies as neurodegenerative and psychiatric diseases. In particular, thyroid state alterations in the adult are related to psychological and mood disorders, as depression. The dentate gyrus (DG) of the hippocampal formation undergoes neurogenesis in adult mammals including humans. The newborn neurons become functionally integrated within the circuitry and could be implicated in learning and memory processes, as well as in mood state. Recent evidence suggests that depressive disorders and their treatment are closely related to the number of newly generated neurons in the DG. Therefore, knowledge about the new granular cell acquisition process and its modulation could be an important tool to palliate cerebral injury and neurodegenerative and psychiatric diseases. Many experimental animal assays show that thyroid hormones (TH) are essential for normal gliogenesis and neurogenesis during development, but there are scarce studies showing this function in the adult.

In this thesis we have analyzed the possible effects of thyroid hormones (TH) on hippocampal neurogenesis in adult rats *in vivo* and have explored the functional relationship related to these effects. Our studies show that a short period of adult onset hypothyroidism impairs normal neurogenesis in the subgranular zone of the DG with a significant decrease in the number of proliferating cells and proliferative units. Hypothyroidism also reduces the number of newborn neuroblasts and immature neurons which have a severely hypoplastic dendritic arborization. These changes in neurogenesis affect some hippocampal dependent functions. Hypothyroid rats present abnormal behavior in the forced swimming test, indicating a depressive-like disorder. Chronic treatment of hypothyroid rats with TH not only normalizes the abnormal behavior but also restores the number of proliferative cells and newborn neuroblasts, and induces growth of their dendritic trees. Therefore, hypothyroidism induces a reversible depressive-like disorder which correlates with changes in neurogenesis.

Our results indicate that TH are essential for adult hippocampal neurogenesis and suggest that mood disorders related to adult-onset hypothyroidism in humans could be due, in part, to impaired neurogenesis. Among other possible clinical implications, these studies could contribute to future therapeutic applications in the modulation of endogenous neurogenesis and mood disorder treatments.

INTRODUCCIÓN

1. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas (HT) son fundamentales en los vertebrados tanto por su papel en el desarrollo del feto como por su acción reguladora del metabolismo durante el resto del ciclo vital. Las HT juegan un papel clave en procesos del metabolismo oxidativo, en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y en el balance electrolítico. Son esenciales para el crecimiento, desarrollo y diferenciación tisular y celular, y para el correcto funcionamiento de numerosos órganos como el hígado, corazón, tejido adiposo y músculo. En concreto, las HT actúan de forma indispensable en el control del desarrollo y maduración del sistema nervioso central (SNC).

La deficiencia de HT durante el desarrollo produce retraso mental severo, anomalías neurológicas, retraso del crecimiento y desarrollo puberal anormal, así como síntomas endocrinos y signos de hipotiroidismo. Algunas de estas alteraciones, en particular las relativas al sistema nervioso (SN), son irreversibles. Las HT son esenciales para el desarrollo del SNC, pero también tienen una gran importancia en el cerebro adulto. En el individuo adulto las alteraciones hormonales pueden ocasionar, además de manifestaciones metabólicas, trastornos de carácter neurológico o psiquiátrico produciendo situaciones patológicas y alteraciones en la conducta.

1.1. Síntesis, secreción y transporte de las hormonas tiroideas

El tiroides sintetiza las HT (Figura 1): tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). En condiciones fisiológicas normales y de aporte suficiente de yodo, la glándula secreta cantidades de T4 (70%) superiores a las de T3 (20%).

El tiroides se localiza en la porción media del cuello, a ambos lados de la tráquea, y está compuesto por folículos. Estos folículos están constituidos por las células epiteliales foliculares o tirocitos que se sitúan en monocapa alrededor de una cavidad central rellena de coloide. Los tirocitos son células polarizadas con una membrana basal del lado del torrente circulatorio y una apical que da al coloide. El yodo es un micronutriente muy escaso pero los tirocitos son capaces de concentrarlo en su interior y sintetizar los precursores de las HT que se almacenan en el coloide. Esto permite la disponibilidad de HT en cuanto se necesiten sin depender de la ingesta de yodo en la dieta.

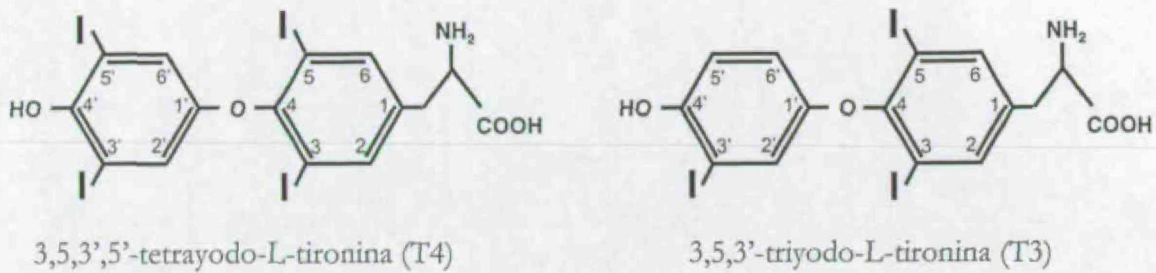


Figura 1. Estructura de las hormonas tiroideas. Las HT están constituidas por dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno. Los átomos de yodo se encuentran en número máximo de cuatro en las posiciones 3, 5, 3' y 5' y su número y posición son críticos para definir la actividad biológica de las HT y sus metabolitos.

La síntesis y secreción de HT está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. En el núcleo paraventricular del hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de tirotropina (TRH) cuya función principal es inducir la secreción de la hormona estimuladora del tiroides (TSH o tirotropina) en la hipófisis anterior. La TSH se une a su receptor de membrana en los tirocitos y estimula la secreción de HT. Además existe un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa que contribuye a la homeostasis hormonal. Las HT actúan directamente sobre la hipófisis inhibiendo la liberación de TSH y sobre el hipotálamo inhibiendo la secreción de TRH.

Las HT circulan en el plasma en su mayor parte unidas a proteínas: la globulina de unión a HT, la transtiretina y la albúmina. La pequeña fracción de T3 y T4 que circulan no unidas a proteínas (libres) son las biológicamente activas, ya que pueden introducirse en las células para llevar a cabo sus acciones biológicas. Recientemente se ha descrito que las HT se transportan al interior celular en los distintos tejidos por transportadores específicos (Jansen y cols., 2005) lo que añade un nuevo mecanismo de regulación de la acción hormonal.

1.2. Metabolismo de las hormonas tiroideas

Las HT se metabolizan en los tejidos periféricos por varias vías, aunque la vía más importante de metabolización es la desyodación progresiva. Las principales reacciones de desyodación son: 1) la activación de la T4 a T3 por desyodación en la posición 5' del anillo externo y 2) la inactivación hormonal de T4 y T3 por desyodación en la posición 5 del anillo interno, produciendo rT3 (T3 reversa o 3,3',5'-triiodotironina) y T2 (3,3'-diiodotironina) respectivamente (Köhrle, 2002).

La desyodasa tipo 1 (D1) cataliza reacciones de activación y, en menor medida, de inactivación. Esta enzima es casi ubicua y se expresa en niveles máximos en órganos que permiten un rápido

intercambio de las HT con el plasma (hígado, piel y riñón). Por ello su actividad contribuye en gran medida a los niveles de T3 plasmáticos. Su expresión en el tiroides también contribuye a la generación de T3 plasmática. La D1 se expresa en el encéfalo de rata (no en humanos), pero su contribución a la generación local de T3 es poco conocida en este tejido.

La desyodasa tipo 2 (D2) cataliza la desyodación de T4 en la posición 5' generando T3, aunque la rT3 también es sustrato de esta enzima. La D2 se expresa en tejidos de intercambio lento, en los que las concentraciones intracelulares de T3 son críticas (sistema nervioso, hipófisis, tejido adiposo marrón). Su función es la generación local de T3 en estos tejidos. En el cerebro, la D2 se expresa en tanicitos y astrocitos (Guadaño-Ferraz y cols., 1997a). Se considera que las neuronas y los oligodendrocitos son las principales células diana de las HT en el SNC. Por esto se ha propuesto un modelo de cooperación paracrina o acoplamiento celular entre los astrocitos y las neuronas y oligodendrocitos.

La desyodasa 3 (D3) inactiva a la T4 y la T3 por desyodación en posición 5, dando lugar a rT3 y T2 respectivamente. Esta enzima se expresa en niveles bajos en todos los tejidos, pero su expresión es más elevada en el SNC, la piel, la placenta y el útero gestante. La D3 contribuye a la homeostasis hormonal protegiendo a los tejidos del exceso de HT. En el encéfalo se expresa en neuronas, su expresión es máxima durante el periodo perinatal (Kaplan y Yaskoski, 1981) y está relacionada con la diferenciación sexual del cerebro (Escámez y cols., 1999).

1.3. Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

1.3.1 Modulación de la expresión génica

La función principal de las HT es la modulación de la expresión génica por unión a sus receptores nucleares específicos (TRs). La T3 es la hormona biológicamente más activa por tener una afinidad unas 10 veces superior que la T4 por la unión a los TRs (Surks y Oppenheimer, 1977). En las células diana, la T3 se concentra de forma eficiente en el núcleo donde se une a sus receptores. Los TRs son factores de transcripción modulados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Los TRs se unen a secuencias específicas del ADN en los genes diana denominadas elementos de respuesta a hormona tiroidea (TRE). La unión de los TRs al TRE tiene lugar, principalmente, formando heterodímeros con el receptor del ácido 9 cis-retinoico (RXR; Figura 2), aunque también pueden homodimerizar (Lazar, 1993).

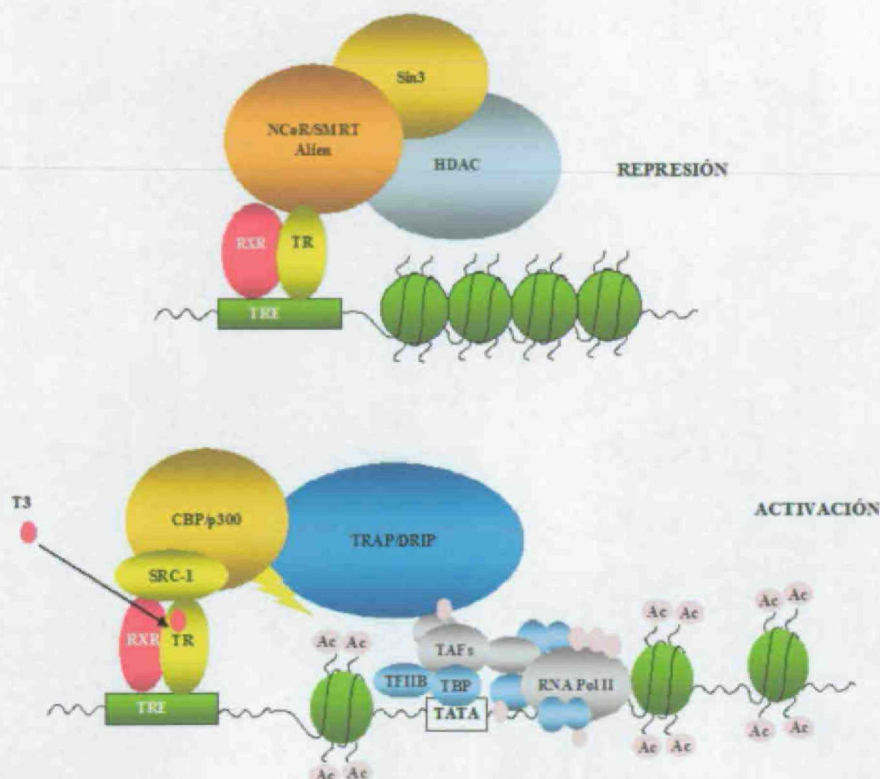


Figura 2.- Modelo del mecanismo de acción general de la modulación de la expresión génica por T3. Los TRs se unen a los TRE heterodimerizando con el receptor RXR. En ausencia de hormona el heterodímero se asocia con un complejo co-represor, lo que conduce a la desacetilación y compactación de la cromatina, y a la represión de la transcripción. La unión de T3 al TR produce un cambio conformacional que induce la liberación de los co-represores y unión de un complejo de co-activadores. Este complejo tiene capacidad acetilasa de histonas, lo que desestabiliza la cromatina y la hace más accesible. Además atrae y estabiliza la ARN polimerasa II.

El mecanismo de acción general de la regulación de la expresión génica por T3 es la regulación positiva (Figura 2). La unión de T3 al TR tiene dos efectos: anula la represión y, dependiendo de la dosis de hormona y del gen diana, aumenta la transcripción (Li y cols., 1999).

Además de este mecanismo general, se puede dar una regulación negativa, cuyo mecanismo es poco conocido. En la regulación negativa, el receptor en ausencia de ligando permite la transcripción basal del gen, y la unión del ligando al receptor induce la represión génica (esto ocurre por ejemplo en el caso de las subunidades de la TSH mediado por TR β 2). No se han identificado secuencias consenso ni requerimientos estructurales comunes para los TREs negativos.

Los TRs están codificados por dos genes: THRA o alfa y THRB o beta, que dan lugar a distintas isoformas.

El gen α codifica una forma funcional, TR α 1, y tres formas truncadas que no unen hormona, TR α 2, TR $\Delta\alpha$ 1 y TR $\Delta\alpha$ 2. La función fisiológica de estas formas truncadas no se conoce con claridad,

aunque la isoforma TR α 2 es muy abundante en neuronas telencefálicas (Guadaño-Ferraz y cols., 1997b). Además de las isoformas descritas, la transcripción en dirección contraria del gen α da lugar a un factor de transcripción, rev-ErbA α (Lazar y cols., 1989; Miyajima y cols., 1989), que desempeña un papel importante en el desarrollo del cerebelo (Chomez y cols., 2000).

El gen β codifica tres formas capaces de unir hormona: TR β 1, TR β 2 y TR β 3, y una forma que une hormona pero no se une al ADN, TR $\Delta\beta$ 3 que actúa como un potente represor *in vitro* (Harvey y Williams, 2002).

Los TRs tienen una estructura muy conservada con un dominio central de unión al ADN, que posee una estructura de dos dedos de zinc (Freedman, 1992). La región carboxi-terminal contiene los dominios de dimerización y unión al ligando y las zonas de interacción con co-activadores y co-represores. La región amino terminal es la más variable y puede contribuir a la especificidad del receptor (Aranda y Pascual, 2001; Yen, 2001).

En el SNC se han encontrado todas las isoformas de los TRs. Las isoformas TR α son más abundantes y están más ampliamente distribuidas en el SNC que las TR β . El conocimiento de la distribución regional de los TRs, así como el análisis de animales transgénicos de los mismos y la utilización de aproximaciones farmacológicas, ha permitido establecer ciertas funciones fisiológicas específicas para las distintas isoformas de receptor en el SNC (Ng y cols., 2001; Guadaño-Ferraz y cols., 2003; Manzano y cols., 2003).

1.3.2. Mecanismos de acción extranucleares de las hormonas tiroideas

Las acciones nucleares de las HT tienen un tiempo de latencia largo (de horas a días). Sin embargo, se han descrito acciones mediadas por HT que ocurren en un periodo de tiempo muy corto (pocos minutos; Yen, 2001). Estas son las respuestas rápidas extranucleares, que son menos conocidas.

Estas acciones parecen estar mediadas por isoformas de los TRs asociadas a la membrana plasmática y/o por nuevos receptores de membrana acoplados a proteínas G señalizando a través de segundos mensajeros intracelulares. Hasta el momento sólo se ha identificado un posible receptor, la integrina α V β 3 (Bergh y cols., 2005). Se ha postulado que las acciones extranucleares de T4 y T3 influyen sobre la transcripción génica a través de las cascadas MAPK y STATs. MAPK activada fosforila los TRs nucleares modulando su actividad sobre la transcripción (Davis y cols.,

2000). Además, el complejo MAPK-TR tiene capacidad de fosforilar a p53, modificando así su actividad transcripcional.

A nivel mitocondrial, las HT ejercen acciones indirectas sobre las mitocondrias regulando la transcripción de genes nucleares cuyos productos modulan la expresión de genes mitocondriales. También se han descrito acciones directas sobre la expresión del genoma mitocondrial y la fosforilación oxidativa. Muchas de estas acciones están mediadas por formas truncadas de los TRs nucleares que modulan la expresión del genoma mitocondrial actuando como factores de transcripción dependientes de ligando (Wrutniak-Cabello y cols., 2001).

1.4. Acciones de las hormonas tiroideas en el sistema nervioso: hipotiroidismo

Las acciones de las HT en el SN son aún más complejas que en otros órganos debido a la heterogeneidad regional y celular de este tejido. Distintos estudios clínicos y experimentales indican que la deficiencia de HT durante el desarrollo causa anomalías anatómicas y funcionales del SN resultando en alteraciones neurológicas graves e irreversibles. Las HT también son necesarias para mantener la actividad y función del SN durante la vida adulta, aunque sus acciones biológicas en el periodo adulto han sido menos estudiadas.

El hipotiroidismo es la deficiencia hormonal más común, siendo más frecuente en las mujeres y aumentando su incidencia con la edad. La frecuencia del hipotiroidismo (clínico y subclínico) en la población adulta es de alrededor de un 8% (Vanderpump y Tunbridge, 2002). El hipotiroidismo está definido por niveles insuficientes de HT en sangre con la consiguiente elevación de la concentración plasmática de TSH. En la práctica clínica se considera hipotiroidismo subclínico cuando sólo se encuentra elevada la TSH.

Las causas más habituales de hipotiroidismo son la disgenesia tiroidea, la ablación quirúrgica o por irradiación del tiroides y la tiroiditis. El consumo de alimentos bociógenos (yuca, mijo, coles), factores iatrógenos (litio, amiodarona, interferón α) o compuestos tóxicos (bifenilos policromados, resorcinol) también puede inducir o agravar el hipotiroidismo.

1.4.1. El hipotiroidismo durante el desarrollo del sistema nervioso

El papel fisiológico de las HT consiste en asegurar la coordinación temporal de diferentes eventos del desarrollo modulando la expresión de genes específicos (Bernal y Guadaño-Ferraz,

1998). El hipotiroidismo durante el desarrollo cerebral conduce a alteraciones moleculares y anatómicas en el cerebro en desarrollo que inducen alteraciones neurológicas y neuropsicológicas irreversibles, como retraso mental, sordera y desórdenes neuromotores. La función tiroidea materna es esencial para el desarrollo del cerebro fetal (Calvo y cols., 2002; Zoeller, 2003; Morreale de Escobar y cols., 2004). Según la OMS, la hipotiroidemia materna por deficiencia de yodo es, después del hambre, la causa de retraso mental prevenible más extendida en el mundo (WHO, 1990). Se ha propuesto que el papel principal de la T3 durante el desarrollo es desreprimir la transcripción de los genes diana en determinadas ventanas de tiempo (Morte y cols., 2002).

Las regiones más afectadas por la deficiencia de HT durante el desarrollo son la neocorteza, los ganglios basales, el cerebelo, el hipocampo y el giro dentado (GD). Estas regiones están implicadas en la memoria y el aprendizaje, así como en tareas motoras, lo que explicaría muchas de las alteraciones funcionales debidas al hipotiroidismo.

La deficiencia de HT afecta a la histogénesis de la neocorteza, produciendo una reducción del crecimiento dendrítico y de la sinaptogénesis (Eayrs, 1955). Las células se encuentran más empaquetadas, lo que se traduce en una disminución del tamaño cerebral. El número de espinas del árbol apical de las neuronas piramidales de la corteza visual se encuentra reducido. Los barriles de la corteza somatosensorial primaria presentan un retraso en su formación y una reducción de sus dimensiones (Berbel y cols., 2001). La deficiencia hormonal también interfiere con la maduración de las comisuras telencefálicas cuerpo calloso y comisura anterior (Berbel y cols., 1994; Guadaño Ferraz y cols., 1994), lo que muy probablemente repercuta en la transferencia de información entre ambos hemisferios cerebrales.

El cerebelo es una región con gran proporción de adquisición celular postnatal. El hipotiroidismo produce un retraso en la migración de las células granulares desde la capa germinativa externa, además de influir en la proliferación y muerte de estas células (Lauder, 1979). También afecta al crecimiento de la arborización dendrítica de las células de Purkinje, aunque el retraso en la adquisición celular y el desarrollo del cerebelo debido al hipotiroidismo implican proporciones anormales de todos los tipos celulares (Legry y cols., 1976).

El hipocampo y el GD son regiones de neurogénesis tardía, por lo que la deficiencia de HT afecta a su desarrollo (Gould y cols., 1991). El hipotiroidismo durante el desarrollo provoca una disminución del número de células granulares en el GD (Rami y cols., 1986b), lo que conlleva la reducción del número de fibras musgosas que proyectan a CA3 y de las sinapsis granulares-

piramidales en esta capa. Las neuronas piramidales de CA3 presentan además atrofia en su arborización dendrítica, lo que se correlaciona con la disminución del volumen de esta región. El hipotiroidismo también afecta al número de neuronas piramidales en CA1 (Madeira y cols., 1992). Estos efectos tan dramáticos en la formación del hipocampo pueden contribuir a las anomalías en el comportamiento que se observan en condiciones de hipotiroidismo.

Los TRs se expresan en neuronas, oligodendrocitos y algunas subpoblaciones de astrocitos (Bradley y cols., 1992; Carlson y cols., 1996; Carre y cols., 1998). La expresión de los TRs presenta diferentes patrones para cada isoforma que además varían durante la ontogenia del SN. Aunque se ha descrito que las HT actúan sobre la proliferación de determinadas poblaciones (glía y neuronas de génesis tardía), se conocen mejor sus acciones sobre la migración, diferenciación y maduración celular (Bernal, 2005).

Como se ha visto anteriormente, la deficiencia de HT bloquea la maduración neuronal, en particular, disminuye el número de axones corticales y provoca alteraciones en el desarrollo, densidad y distribución de las dendritas, reduciendo el número de espinas, todo lo cual conlleva importantes alteraciones en la sinaptogénesis.

Las HT controlan la proliferación y diferenciación de los precursores de oligodendrocitos y modulan la producción de lípidos mielínicos. El hipotiroidismo impide la correcta diferenciación de los oligodendrocitos, lo que provoca un retraso en la mielinización y una disminución del número de axones mielínicos, con las consiguientes alteraciones funcionales en la transmisión del impulso nervioso.

Además, la deficiencia de HT altera la maduración de las células de glía radial en CA1 y la glía de Bergmann en cerebelo, lo que se relaciona con las alteraciones en la migración celular detectadas en los animales hipotiroideos.

1.4.2. El hipotiroidismo en el sistema nervioso adulto

Estudios fisiológicos de los años 50 y 60 afirmaban que las variaciones del estado tiroideo no afectaban al consumo de oxígeno en el cerebro humano adulto (Sensenbach y cols., 1954), sugiriendo que el cerebro adulto, a diferencia del cerebro en desarrollo, era poco sensible a la acción de las HT. La repercusión de estos estudios ha contribuido a que se haya tardado en reconocer la acción de las HT en el funcionamiento del SN adulto.

Evidencias experimentales posteriores mostraron que el cerebro adulto responde metabólicamente al estado tiroideo (Chapa y cols., 1995; Calza y cols., 1997). Además se han descrito diversas alteraciones anatómicas por deficiencia de HT en estadios postnatales. Se ha descrito una disminución del número de neuronas granulares en el GD de ratas adultas tras 150d de hipotiroidismo, aunque el volumen de la capa granular no se modifica (Madeira y cols., 1991). En estos animales también se observa una reducción en el número de neuronas piramidales de CA1 y alteraciones estructurales en CA3 (Madeira y cols., 1992). El hipotiroidismo en ratas adultas también afecta al número y la distribución de espinas dendríticas en neuronas corticales, que se puede evitar con un tratamiento de reemplazo hormonal (Ruiz-Marcos y cols., 1980). Esto sugiere además la participación de las HT en procesos de plasticidad en el SN adulto.

Además hay varios hechos que indican la importancia de las HT en el funcionamiento del SN adulto en humanos. Se han descrito importantes disfunciones mentales y psicológicas asociadas al hipotiroidismo (Boyages, 1996; Whybrow, 1996). El hipotiroidismo adulto provoca alteraciones de la memoria, el aprendizaje y la concentración, astenia psicomotora, alteración de los niveles de neurotransmisores y alteraciones del comportamiento (demencia, confusión, psicosis y cambios de personalidad) y del estado de ánimo (depresión, trastorno bipolar).

Muchos de los síntomas asociados al hipotiroidismo también son frecuentes en pacientes con depresión por lo que se ha establecido una relación entre las HT y los desórdenes del estado de ánimo. Se ha determinado que entre un 8-17% de los pacientes con depresión presentan hipotiroidismo (Gold y cols., 1981; Prange, 1996), siendo subclínico en la mayoría de los casos. Además esta frecuencia aumenta en pacientes refractarios al tratamiento con fármacos antidepresivos (Howland, 1993; Gloger y cols., 1997). Por estos motivos, se recomienda examinar la función tiroidea de pacientes con desórdenes del estado de ánimo y tratar las disfunciones tiroideas subclínicas con HT. También se recomienda que los pacientes hipotiroideos con trastornos del estado de ánimo sigan terapias de reemplazo hormonal con criterios más estrictos que los pacientes sin patología psiquiátrica (Haggerty y Prange, 1995).

En los pacientes con trastornos del estado de ánimo sin enfermedad tiroidea que responden al tratamiento con fármacos antidepresivos, el tratamiento adyuvante con HT (T3 o T4) se usa como acelerador de la respuesta (Prange y cols., 1969; Altshuler y cols., 2001). En los pacientes refractarios o que responden parcialmente al tratamiento con fármacos antidepresivos, el tratamiento con HT se utiliza como potenciador de las acciones de los antidepresivos (Joffe y Singer, 1990; Aronson y cols., 1996). En regiones implicadas en la modulación del estado de ánimo,

como la amígdala y el hipocampo, se han encontrado niveles elevados de TRs en el adulto (Puymirat y cols., 1991), lo que puede contribuir a explicar estas acciones de las HT en la depresión.

La patogénesis de la depresión no se conoce en profundidad y parece ser multifactorial. Aunque los mecanismos subyacentes por los que el funcionamiento tiroideo participa en la modulación de la psicopatología del estado de ánimo y la ansiedad no son del todo conocidos, hay al menos dos hipótesis que pueden explicar las causas de la depresión y el mecanismo de acción de las HT en estos pacientes. Estas hipótesis no tienen por qué ser incompatibles y pueden ser complementarias.

Por un lado, se ha postulado la importancia de la deficiencia de serotonina cerebral en la depresión (Prange y cols., 1974) y se ha estudiado la acción de la T3 en la modulación de la concentración de serotonina intracerebral (Kirkegaard y Faber, 1998). Se ha descrito que la serotonina intracerebral disminuye en el hipotiroidismo y aumenta en el hipertiroidismo (Singhal y cols., 1975; Sandrini y cols., 1996). En este caso, la administración de HT en pacientes depresivos produciría un aumento en la neurotransmisión serotoninérgica, ejerciendo un efecto antidepresivo.

Por otro lado, se ha relacionado la depresión con la deficiencia cerebral de catecolaminas, especialmente norepinefrina (Schildkraut, 1965). Se ha propuesto que las HT pueden actuar modulando el número de receptores postsinápticos alfa y beta adrenérgicos (Whybrow y Prange, 1981; Rozanov y Dratman, 1996). En el hipotiroidismo, la disminución de receptores adrenérgicos podría explicar la hipoactividad neuronal y los efectos anímicos asociados. En depresión, el efecto beneficioso del tratamiento coadyuvante con HT podría explicarse también por la activación de la neurotransmisión catecolaminérgica.

En esta tesis además se aborda una tercera hipótesis: la posible influencia del estado tiroideo en el mantenimiento del estado de ánimo por la modulación de la neurogénesis adulta en el giro dentado.

2. LA FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO

La formación del hipocampo es una arquicorteza derivada del palio medial y forma parte de las allocortezas trilaminares. Está formada por el giro dentado (GD), el cuerno de Amón (CA) o hipocampo propiamente dicho y el subículo, que presentan una única capa de somas neuronales densamente empaquetados entre dos capas de células dispersas (Ramón y Cajal, 1911). La corteza entorrinal adyacente es una periarquicorteza (mesocorteza) que recibe aferencias de las cortezas asociativas, parahipocampal y perirrinal. Además la corteza entorrinal es la fuente de la mayoría de las aferencias que recibe la formación del hipocampo. La formación del hipocampo presenta una gran plasticidad estructural y funcional y está implicada en muchos procesos neurales, en particular el aprendizaje y la memoria.

Esta tesis se centra en el estudio de las acciones de las HT en el GD y el hipocampo en la rata adulta. Como se ha descrito anteriormente, estas regiones son diana de HT durante el desarrollo, pero también en el adulto (Rami y cols., 1986a; Rami y cols., 1986b; Gould y cols., 1991; Madeira y cols., 1991; Madeira y cols., 1992).

2.1 Anatomía del giro dentado en la rata adulta

La capa celular principal del GD es la capa de células granulares. Las células granulares se disponen en una lámina intermedia cuyas dendritas apicales se orientan hacia la capa superficial (molecular) y sus axones hacia la capa más profunda (polimórfica o hilio). En la capa de células granulares se pueden distinguir una hoja dorsal o suprapiramidal y una ventral o infrapiramidal, con respecto a la situación de las neuronas piramidales (Figura 3).

Las células granulares reciben aferencias de la corteza entorrinal o parahipocampal, que perforan el surco del hipocampo (vía perforante) y alcanzan las dendritas apicales en la capa molecular. Los axones de las células granulares abandonan el GD a través del hilio y de CA4 y se extienden hasta CA3 atravesando el estrato lúcido. Son axones altamente ramificados y se denominan fibras musgosas. Las fibras musgosas forman sinapsis complejas con las espinas especiales, largas y muy ramificadas de las células piramidales de CA3.

En el borde interno de la capa granular también se localizan células en cesto. Estas células presentan un axón muy ramificado y confinado a la capa granular y son capaces de inhibir

simultáneamente un elevado número de células granulares. En la capa molecular y en el hilus también se encuentran varios subtipos de interneuronas GABAérgicas.

2.2 Anatomía del hipocampo en la rata adulta

La capa principal del hipocampo es la capa de células piramidales. Esta capa agrupa los somas de las neuronas piramidales excitatorias y se subdivide en 4 regiones: CA3 y CA1 son las más importantes, CA2 es más pequeña y se sitúa entre ellas y CA4 está incluida en el hilio del GD. Estas regiones presentan diferencias en el tamaño celular y el patrón de conectividad. Las neuronas de CA1 tienen somas más pequeños y están más empaquetadas. En CA1 y CA2, las neuronas piramidales carecen de las espinas dendríticas típicas de CA3 y de sus aferencias musgosas. Los otros estratos son el lacunosum-moleculare (continuación de la capa molecular de la corteza entorrinal), el radiatum (que aloja las dendritas apicales de las neuronas piramidales), el lucidum (sólo presente en CA3), el oriens (que contiene los axones de las neuronas piramidales) y el álveo, en el que se reúnen los axones de las neuronas piramidales hacia la fimbria.

Las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 reciben las fibras musgosas y sus axones proyectan por un lado al álveo y por otro a las dendritas apicales de CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Los axones de CA1 también se bifurcan y proyectan al álveo (hacia el hipotálamo) y al subículo. Las neuronas del subículo proyectan la información de vuelta a la corteza entorrinal pero a neuronas de distintas capas de las que partió la vía perforante.

En la capa piramidal y en el stratum oriens se encuentran la mayoría de las células en cesto y candelabro. Estas células son interneuronas inhibitorias GABAérgicas que están implicadas en la modulación de la actividad eferente en las neuronas piramidales.

Las capas de células no piramidales del hipocampo contienen un número pequeño de neuronas. Estas neuronas tienen somas con diferentes morfologías y presentan distintos patrones de arborización dendrítica y axonal (Ramón y Cajal, 1905).

2.3. Conexiones de la formación del hipocampo

Las conexiones de la formación del hipocampo son principalmente unidireccionales y forman un bucle cerrado que se origina en la corteza entorrinal (Figura 3). Aunque la vía perforante es la aferencia principal a la formación del hipocampo, existe otra vía de entrada de información a la formación del hipocampo desde la corteza entorrinal a través de la capa molecular del subículo, alcanzando las dendritas apicales de CA3. Una tercera vía de entrada de información (modulatoria)

son las aferencias procedentes del septo, hipotálamo y tronco del encéfalo a través del fórnix que contacta con las dendritas basales de las neuronas piramidales de CA1.

En la corteza entorrinal converge la información aferente, procedente de las cortezas asociativas orbitofrontal, insular y cingular, y la información que devuelve la formación del hipocampo. El hipocampo y el GD reciben también aferencias importantes de la amígdala, tálamo, septo, hipotálamo y núcleos monoaminérgicos del tronco del encéfalo a través de la corteza entorrinal. Además reciben aferencias comisurales del hipocampo contralateral.

En este circuito simplificado, habría que incluir las sinapsis entre las células principales y las interneuronas inhibitorias y las sinapsis asociativas entre las células principales.

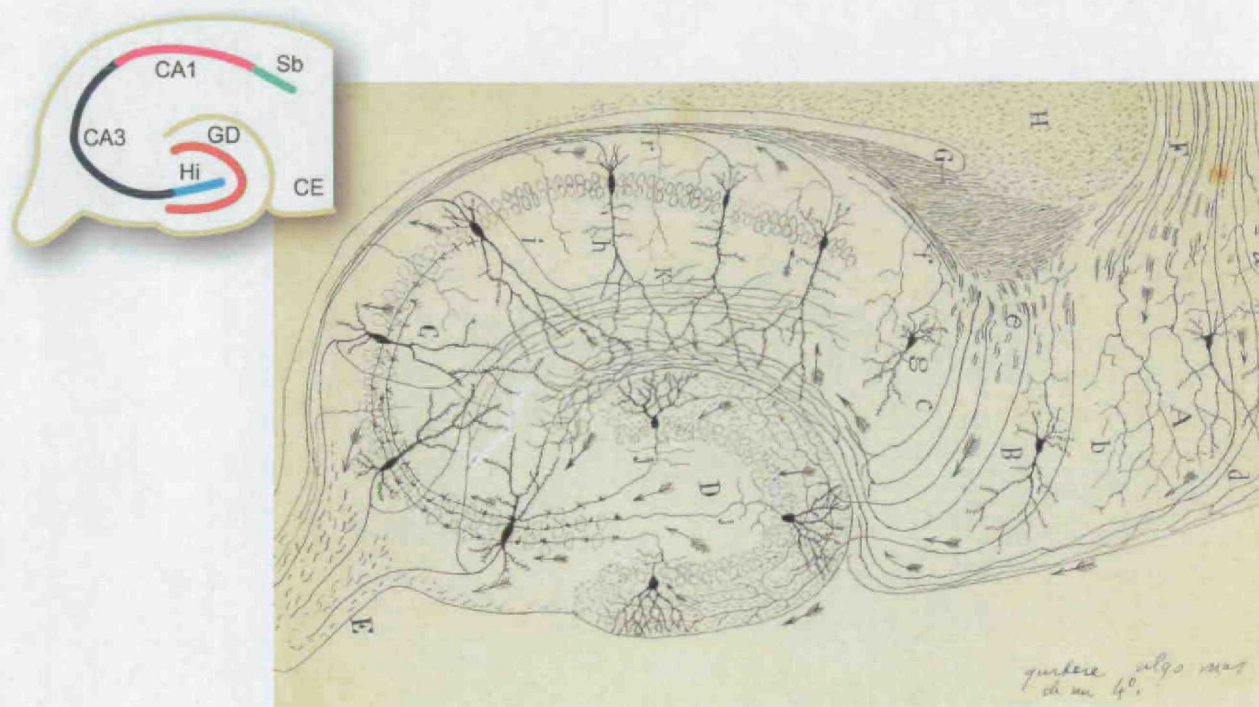


Figura 3. La formación del hipocampo y sus conexiones. En pequeño, esquema de las diferentes regiones: CE, corteza entorrinal; GD, giro dentado; Hi, hilus; CA1-CA3, regiones del hipocampo; Sb, subículo. En grande, dibujo esquemático de la formación del hipocampo y sus principales proyecciones (Ramón y Cajal, 1901). Las flechas indican la direccionalidad de las conexiones.

2.4 Funciones de la formación del hipocampo

2.4.1 Adquisición y consolidación de memorias

El sistema nervioso puede modificar su estructura y su dinámica como consecuencia de la experiencia. La plasticidad neuronal consiste en la capacidad de las neuronas para modificar sus propiedades, así como sus patrones de conexiones con otras neuronas. El resultado de estos cambios es una adaptación del organismo al medio (Kolb, 1999). A nivel celular, la plasticidad es una modificación de las propiedades electrofisiológicas de la neurona. La sinapsis no es una estructura rígida sino que puede variar a causa de los patrones de actividad cerebral. En muchas sinapsis una actividad repetitiva puede conducir no sólo a una alteración de corto plazo, sino a modificaciones duraderas e incluso permanentes. El principal fenómeno asociado a estos cambios es la potenciación a largo plazo (LTP). La LTP se expresa como un aumento persistente de la transmisión sináptica tras estimular una vía aferente con pulsos de corriente eléctrica de alta frecuencia. La LTP se describió por primera vez en el hipocampo y se ha postulado que es la base del aprendizaje y la memoria (Bliss y Gardner-Medwin, 1973; Bliss y Collingridge, 1993).

Se distinguen varios tipos de memoria. La memoria de trabajo es la capacidad de mantener y usar la información de forma transitoria. La memoria explícita o declarativa, que requiere el recuerdo consciente de hechos o eventos. La memoria implícita o no declarativa, que utiliza estrategias o habilidades inconscientes. Estos tipos de memoria residen en regiones diferentes del cerebro.

Evidencias tanto experimentales como de pacientes con daños en la formación del hipocampo indican que la formación del hipocampo está implicada en la formación y consolidación de memorias explícitas (Scoville y Milner, 1957; Zola-Morgan y cols., 1994; Mishkin y cols., 1997), es decir, de la formación de memorias a largo plazo (Milner y cols., 1998). Esa información se transfiere después a la neocorteza, donde se almacena. La consolidación de la memoria parece producirse por un proceso de LTP en los terminales de la vía perforante en el GD y en las sinapsis de neuronas piramidales de CA3 con neuronas de CA1 (vía colateral de Schaffer).

También se ha podido comprobar que el estado emocional y motivacional es decisivo para la consolidación de la memoria (Aggleton, 1993). Se ha observado que la LTP también puede verse influida por estos factores. En esta relación entre motivación y memoria pueden estar implicadas las interacciones entre la formación del hipocampo y la amígdala (ver siguiente apartado).



2.4.2 Mantenimiento del estado de ánimo

La formación del hipocampo tiene un papel indirecto sobre las emociones a través de su relación con la amígdala. Ambas forman parte del sistema límbico, que engloba áreas del encéfalo relacionadas con la emoción y las vías que las interconectan. El sistema límbico, además de influir sobre la emoción, lo hace sobre funciones cognitivas, especialmente la memoria.

La amígdala está implicada en la formación y consolidación de memorias emocionales y podría actuar como refuerzo de la adquisición y el almacenamiento de memorias en otras zonas del cerebro entre las que se incluyen el GD y el hipocampo (LeDoux, 1993; McGaugh y cols., 1996).

La amígdala presenta numerosas conexiones recíprocas con otras estructuras límbicas y con la neocorteza (Maren, 1996). Las conexiones entre la amígdala y el hipocampo no son directas. La amígdala proyecta al septo y a la corteza entorrinal, que constituyen las principales aferencias colinérgica y glutamatérgica, respectivamente, al hipocampo (Brown y Zador, 1990).

La formación del hipocampo es una región de elevada plasticidad y, aunque no debe ser la única responsable de los síntomas observados en la depresión, parece jugar un papel central en la enfermedad depresiva. Algunos estudios han encontrado reducciones significativas del volumen del hipocampo en pacientes con depresión en un rango entre el 8% y el 19% (Sheline y cols., 1996; Shah y cols., 1998; Sheline y cols., 1999; Bremner y cols., 2000), pero otros no (Axelson y cols., 1993; Ashtari y cols., 1999; Vakili y cols., 2000). Estas discrepancias parecen deberse a diferencias metodológicas (resolución de la técnica utilizada, discriminación entre estructuras como el hipocampo y la amígdala, heterogeneidad de los sujetos de la muestra y de las causas de la depresión).

En algunos estudios con pacientes con depresión, la pérdida de volumen hipocampal parece tener un significado funcional. Se han relacionado la depresión y la atrofia hipocampal con alteraciones de la memoria verbal, que es una forma de memoria explícita (Sheline y cols., 1999). Por otro lado, se ha observado que la depresión afecta a la memoria explícita sin afectar generalmente a la memoria implícita (Roediger y McDermott, 1992; Bazin y cols., 1994), ni a la memoria de trabajo (Zakzanis y cols., 1998; Harmer y cols., 2002).

También cambios del volumen del GD parecen tener consecuencias para las funciones cognitivas de la formación del hipocampo. En experimentos con roedores, el enriquecimiento del ambiente induce un aumento del volumen del GD que se acompaña de un mejor desarrollo de tareas de aprendizaje espacial (Kempermann y cols., 1997).

3. NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

La neurogénesis o generación de nuevas neuronas comprende varios procesos: proliferación, migración, diferenciación, maduración y supervivencia celular.

El sistema nervioso tiene un poder de regeneración y reparación muy limitado en comparación con otros tejidos o sistemas. El dogma clásico determinaba que la neurogénesis se limitaba al desarrollo embrionario y postnatal temprano y que la población neuronal del individuo adulto no podía ser reemplazada (Ramón y Cajal, 1914). Aunque se habían detectado figuras mitóticas en el cerebro de animales adultos, siempre se relacionaron con la generación de células gliales. La heterogeneidad celular y la complejidad estructural del SNC parecían explicar la ausencia de recambio neuronal en el cerebro adulto.

En la década de 1960, la introducción del uso de la timidina tritiada y las técnicas autorradiográficas permitieron la detección de células en fase de síntesis de ADN en tejido nervioso de animales adultos. Los trabajos pioneros de Altman indicaron la existencia de neurogénesis en el bulbo olfatorio, formación del hipocampo y neocorteza cerebral (Altman, 1962, 1963; Altman y Das, 1965; Altman, 1969). Estas observaciones fueron corroboradas más tarde por Kaplan, combinando la autorradiografía con la microscopía electrónica (Kaplan y Hinds, 1977; Kaplan, 1985). Sin embargo, todos estos estudios fueron recibidos con gran escepticismo por la comunidad científica.

El conocimiento de la neurogénesis adulta recibió un gran impulso con los estudios del grupo de Nottebohm sobre el recambio neuronal estacional en el centro vocal de los canarios (Goldman y Nottebohm, 1983; Paton y Nottebohm, 1984). Sin embargo, hubo que esperar hasta la década de 1990 para que empezara a derrumbarse el dogma clásico y se aceptara la existencia de neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos (Cameron y cols., 1993; Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Luskin, 1993; Kuhn y cols., 1996), incluido el hombre (Eriksson y cols., 1998; Sanai y cols., 2004). La introducción del uso de la bromodeoxiuridina (BrdU) fue determinante para estos descubrimientos. La BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN de células en proliferación y puede detectarse por inmunohistoquímica. También fue relevante el uso de marcadores específicos de tipo celular para identificar el fenotipo de las células generadas *de novo*. Más recientemente, se han empezado a utilizar anticuerpos para detectar por inmunohistoquímica antígenos de proliferación endógenos, que marcan células en diferentes fases proliferativas del ciclo celular (Ki67, fosfohistona H3, PCNA).

El descubrimiento de la neurogénesis en el adulto representa un hito en la historia de la neurobiología que ha abierto nuevos campos de investigación. Aunque sigue siendo válida la afirmación de que las neuronas maduras han perdido la capacidad de dividirse, se ha constatado que en el cerebro adulto persisten poblaciones de células madre o precursores neurales con capacidad para proliferar y generar neuronas y/o células gliales.

3.1 Zonas neurogénicas en el cerebro de la rata adulta

La presencia de células madre o precursores neurales se ha descrito en varias zonas del cerebro maduro, incluyendo el estriado, neocorteza y cuerpo calloso (Palmer y cols., 1995) e incluso en la médula espinal (Weiss y cols., 1996). Sin embargo, en el cerebro adulto, la presencia de células madre con linaje neuronal se restringe a dos zonas concretas: la zona subventricular (ZSV) adyacente a los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG) del GD de la formación del hipocampo (Figuras 4 y 5; Alvarez-Buylla y Lim, 2004). En otras zonas, las células madre sólo generan células gliales, aunque *in vitro* y en un entorno neurogénico son capaces de generar neuronas (Herrera y cols., 1999; Shihabuddin y cols., 2000). Esto indica que el ambiente local es muy importante en la determinación del destino de los precursores neurales (Suhonen y cols., 1996).

3.1.2 La zona subventricular de los ventrículos laterales

Los precursores generados en la ZSV migran varios milímetros tangencialmente hacia el bulbo olfatorio por una vía restringida llamada camino migrador rostral (CMR). Una vez en el bulbo, los neuroblastos migran radialmente hacia las capas granular y periglomerular, donde diferencian a neuronas GABAérgicas granulares y periglomerulares (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Winner y cols., 2002). Se ha descrito que el CMR está constituido por gliotubos, formados por astrocitos que recubren a los neuroblastos en su camino hacia el bulbo olfatorio. Se ha postulado que el gliotubo provee de información direccional y genera un microambiente que favorece la migración (Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002).

También se ha sugerido que la ZSV podría ser la fuente de nuevas neuronas para la neocorteza (Gould y cols., 1999a), pero esta posibilidad ha generado gran controversia (Kornack y Rakic, 2001) y son necesarios más estudios para corroborarla. En la ZSV también se originan células gliales destinadas a diferentes regiones del cerebro.

Estudios *in vitro* han revelado la existencia de células madre neurales en la ZSV (Morshead y cols., 1994). Los cultivos realizados con tejido de esta región dan lugar a agregados celulares denominados neurosféricas. Algunas de las células que componen las neurosféricas presentan las características de autorenovación (son capaces de volver a generar neurosféricas en sucesivos pases) y de pluripotencialidad (generan neuronas, astrocitos y oligodendrocitos).

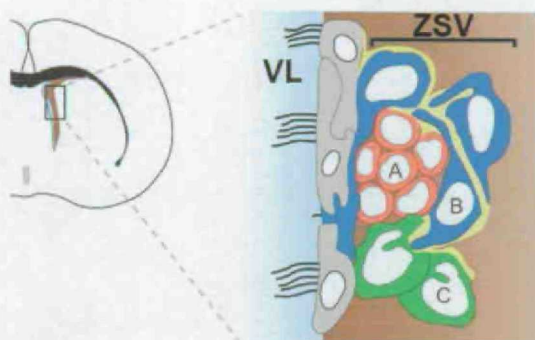


Figura 4. Esquema de la organización celular en la zona subventricular. Se representa un grupo típico de células A (migradoras) rodeadas de células B (astrocitos células madre) y cercanas a las células C (progenitores intermedios). En gris, endotelios. ZSV, zona subventricular; VL, ventrículo lateral. Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002.

En la ZSV, se ha descrito que las células madre generadoras de los precursores neuronales tienen características de astrocitos (Doetsch y cols., 1999). Aunque esta hipótesis cuenta con multitud de evidencias experimentales, hay investigadores que sostienen que las células del epéndimo ventricular serían las células madre de la ZSV (Johansson y cols., 1999). Según el modelo astrocítico (Doetsch y cols., 1997; Figura 4), las células madre con características de astrocitos (células B) se dividen ocasionalmente y de forma asimétrica, generando una célula madre y un precursor intermedio o célula C. Los precursores intermedios tienen una elevada actividad mitótica, amplificando así su población. Estas células dan lugar a los neuroblastos migradores (células A), que también tienen actividad mitogénica y se organizan en cadenas para recorrer el CMR hasta el bulbo olfatorio.

3.1.3 La zona subgranular del giro dentado

En la ZSG se generan neuroblastos que migran tan sólo unas micras hasta integrarse en la capa granular del GD donde extienden procesos y se diferencian a neuronas granulares (Christie y Cameron, 2006; Figura 5). En esta región, a diferencia de la ZSV, se producen muy pocas células gliales (Cameron y cols., 1993). La tasa neurogénica de la ZSG, aunque importante para esta región, es menor que en la ZSV.

Estudios *in vitro* han demostrado que a partir de tejido hipocampal adulto se pueden generar neurosféricas con características de autorenovación y pluripotencialidad similares a las de la ZSV (Gage y cols., 1995).

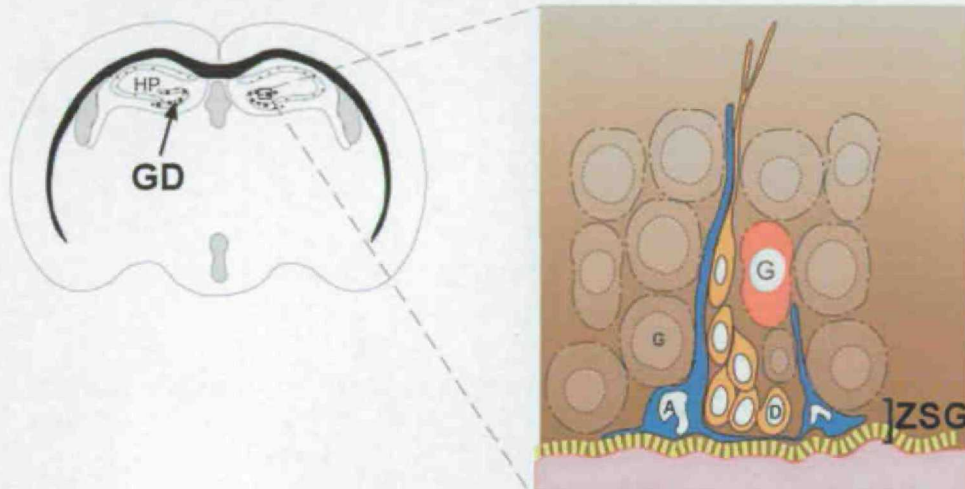


Figura 5. Esquema de la organización celular en la zona subgranular del giro dentado. Los astrocitos (A) generan y rodean a los progenitores intermedios (células D), que dan lugar a las células granulares (G). Seri y cols., 2004.

En la ZSG se ha determinado que las células madre generadoras de los precursores neuronales también tienen características de astrocitos (Seri y cols., 2001). Estos astrocitos dan lugar a las neuronas granulares a través de una serie de precursores intermedios de complejidad morfológica creciente (células D). El astrocito genera por división asimétrica otro astrocito y una célula D1. La célula D1 es un precursor intermedio sin procesos y con capacidad mitogénica, que genera dos células D2. Las células D2 son postmitóticas y al ir extendiendo sus procesos, dan lugar a las células D3. Estas células presentan características de neuronas inmaduras y tras su maduración dan lugar a las neuronas granulares del GD (Seri y cols., 2004; Figura 5). En la ZSG, los precursores neuronales se encuentran agrupados en unidades proliferativas, en las que los procesos del astrocito rodean a las células D formando un nido (Figura 5). Así la célula madre aísla a las células D del hilus y, probablemente, intercambia con ellas señales necesarias para su diferenciación y maduración (Seri y cols., 2004). Los neuroblastos y las neuronas inmaduras del GD adulto expresan la proteína doblecortina (DCX; Nacher y cols., 2001). Esta proteína del citoesqueleto también se expresa por neuroblastos y neuronas inmaduras en distintas regiones cerebrales durante el desarrollo (Gleeson y cols., 1999).

De las miles de nuevas células que se generan cada día en la ZSG (~9000; Cameron y McKay, 2001), una gran parte muere en poco tiempo. Se ha estimado que en condiciones normales alrededor del 50% de las nuevas células generadas mueren durante el primer mes y parece que después la tasa de muerte se reduce considerablemente (Dayer y cols., 2003). Probablemente, al final sólo sobreviven las células capaces de establecer contactos sinápticos funcionales con otras neuronas, al igual que ocurre durante el desarrollo (Burek y Oppenheim, 1996).

3.2 Factores moduladores de la neurogénesis en el adulto

Los mecanismos que controlan la proliferación de los progenitores neurales no se conocen en profundidad, pero se ha observado que pueden estar influidos por diversos factores circulantes, incluyendo ciertas hormonas. Estos factores pueden influir de forma diferente en la capacidad proliferativa de las dos zonas neurogénicas. Los esteroides adrenales reducen de forma natural la producción de nuevas neuronas en el GD (Cameron y Gould, 1994) probablemente activando receptores de tipo NMDA (Cameron y cols., 1998). Por el contrario, la adrenalectomía aumenta la proliferación en el GD (Montaron y cols., 1999). Los estrógenos sin embargo aumentan la proliferación en el GD y la ovariectomía reduce la proliferación en esta región y aumenta la muerte celular (Tanapat y cols., 1999). La prolactina no tiene efectos sobre la neurogénesis en el GD pero estimula la producción de progenitores en la ZSV (Shingo y cols., 2003).

Los factores de crecimiento, en general, estimulan la proliferación. FGF-2 y EGF tienen efectos característicos sobre los progenitores de la SZV y del GD (Craig y cols., 1996; Jin y cols., 2002). BDNF es necesario para la neurogénesis en el GD (Lee y cols., 2002) y la administración de IGF-1 promueve la neurogénesis en esta región (Aberg y cols., 2000).

La neurogénesis también se modula por diferentes neurotransmisores. El glutamato, actuando a través de los receptores de tipo NMDA, reduce la neurogénesis en el GD (Cameron y cols., 1995; Cameron y cols., 1998), mientras que la serotonina la aumenta tanto en GD como en ZSV (Brezun y Daszuta, 1999). La norepinefrina tiene efectos diferenciales en ambas regiones: en el GD su déficit reduce la proliferación sin afectar a la diferenciación ni a la supervivencia celular (Kulkarni y cols., 2002), mientras que en la ZSV el bloqueo de sus receptores $\alpha 2$ no altera la proliferación pero aumenta la supervivencia neuronal en el bulbo olfatorio (Bauer y cols., 2003).

La neurogénesis, además de estar modulada por factores internos, lo está por factores externos. La exposición a factores ambientales como el enriquecimiento del ambiente y el ejercicio voluntario estimulan la neurogénesis en el GD (Brown y cols., 2003a). También el entrenamiento específico

con tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo aumenta la supervivencia de las nuevas neuronas en el GD (Gould y cols., 1999b). Por otro lado, las situaciones de estrés, que se sabe aumentan los niveles de glucocorticoides circulantes, disminuye la tasa de neurogénesis en el GD (Pham y cols., 2003).

La administración de diferentes drogas de abuso como los opiáceos, la nicotina o el etanol, también disminuye la neurogénesis en el GD (Eisch y cols., 2000; Abrous y cols., 2002; Herrera y cols., 2003).

3.3 Funciones de la neurogénesis en el cerebro adulto

Estudios recientes indican que las neuronas generadas *de novo* en las zonas neurogénicas adultas se incorporan en circuitos neuronales y maduran como neuronas funcionales (van Praag y cols., 2002; Carleton y cols., 2003). Algunas de las neuronas generadas *de novo* sobreviven durante tiempos largos tanto en el bulbo olfatorio como en el GD (Winner y cols., 2002; Kempermann y cols., 2003). Todo esto indica que la neurogénesis en el cerebro adulto debe tener un significado funcional (Kempermann y cols., 2004).

Se piensa que la generación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio podría relacionarse funcionalmente con la discriminación de olores. La actividad olfativa regula la neurogénesis en esta zona (Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002; Rochefort y cols., 2002). También se ha postulado que el aumento en el número de neuronas olfatorias, debido al aumento de los niveles de estrógenos y prolactina asociados al ciclo estral y la preñez, puede estar implicado en la necesidad de preparar el sentido del olfato para la discriminación de las crías (Tanapat y cols., 1999; Shingo y cols., 2003). En el hombre, aunque se ha descrito la existencia de progenitores en la ZSV, hasta el momento no se ha identificado un camino migrador (Sanai y cols., 2004; Quiñones-Hinojosa y cols., 2006), por lo que la neurogénesis en esta región puede no tener el mismo significado funcional que en roedores.

Estudios con animales de experimentación han relacionado funcionalmente la generación de nuevas neuronas en el GD con ciertas formas de aprendizaje asociativo en la formación del hipocampo. Se ha descrito que el aprendizaje de una tarea de condicionamiento del parpadeo con un paradigma de traza (que depende de la función hipocampal) se ve impedido por la reducción de la neurogénesis tras el tratamiento con un agente citostático (Shors y cols., 2002). También se ha determinado que factores neuroendocrinos que modulan la neurogénesis en el GD, como los glucocorticoides y los estrógenos, así como las experiencias estresantes y el ejercicio físico modifican el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo (Luine y cols., 1994; Bodnoff y cols.,

1995; Luine y cols., 1998; van Praag y cols., 1999). Se ha propuesto que las nuevas neuronas permitirían al hipocampo optimizar las conexiones entre el GD y CA3 de manera dependiente de la actividad y la experiencia (Kempermann, 2002). Esto permitiría al sistema desenvolverse de una manera adecuada y eficiente ante las novedades y la complejidad que se encuentra el individuo cada día.

En el GD humano también se ha descrito neurogénesis (Eriksson y cols., 1998). Como se explicó más arriba, la formación del hipocampo contribuye al menos a algunos de los síntomas de la depresión, ya sea directamente o a través de sus aferencias a otras regiones cerebrales relacionadas con el estado de ánimo (Manji y cols., 2001). Se ha propuesto que la atrofia hipocampal que se observa en pacientes con depresión se puede deber a la muerte o atrofia de neuronas preexistentes en esta región. Recientemente algunas teorías apuntan a que fallos en la neurogénesis adulta en el GD pueden ser parcialmente responsables de los trastornos depresivos (Santarelli y cols., 2003; Duman, 2004). Es bien conocido que es necesaria la administración crónica de los fármacos antidepresivos para conseguir un efecto terapéutico sobre la depresión. Se ha descrito que el tratamiento crónico con estos fármacos, pero no el tratamiento agudo, aumenta la proliferación en el hipocampo adulto (Malberg y cols., 2000; Nakagawa y cols., 2002; Santarelli y cols., 2003). Por ello se piensa que el tiempo que tardan en ser eficaces los antidepresivos puede estar muy relacionado con el tiempo necesario para estimular la generación y maduración de nuevas neuronas en el GD. También se ha descrito que el bloqueo de la neurogénesis inducida por los antidepresivos bloquea la respuesta conductual de estos fármacos (Santarelli y cols., 2003). Parece que la reducción de la proliferación celular y de la neurogénesis en el GD puede estar implicada en la patofisiología de la depresión y que revertir o prevenir la reducción de la neurogénesis puede ser un mecanismo de acción común de los distintos fármacos antidepresivos (Duman y cols., 2001; Kempermann y Kronenberg, 2003; Malberg, 2004).

Por último, se ha descrito que diferentes situaciones patológicas, como la isquemia o lesiones cerebrales, son capaces de estimular la generación de nuevas neuronas en regiones distintas del bulbo olfatorio y del GD (Gould y Tanapat, 1997; Magavi y cols., 2000; Arvidsson y cols., 2002; Nakatomi y cols., 2002; Teramoto y cols., 2003), quizás actuando como un mecanismo reparador. Debido a esto se considera que el conocimiento de los mecanismos de activación y modulación endógena de la neurogénesis podría servir en un futuro para combatir los daños cerebrales y las enfermedades neurodegenerativas usando la terapia celular.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido analizar la posible modulación de la neurogénesis en el giro dentado en ratas adultas por hormonas tiroideas y explorar las posibles implicaciones funcionales resultantes de esta modulación hormonal.

Para alcanzar este objetivo nos hemos planteado:

- Desarrollar un modelo experimental de ratas adultas con distinto estado tiroideo (ratas eutiroideas, hipotiroideas e hipotiroideas con un tratamiento de reemplazo hormonal) y en estos animales:
- Analizar la capacidad proliferativa y la generación de nuevas neuronas en el giro dentado.
- Estudiar la funcionalidad de la formación del hipocampo, analizando con distintas pruebas la tendencia al comportamiento de tipo depresivo y la memoria dependiente del hipocampo.
- Determinar si el reemplazo hormonal es capaz de revertir las anomalías observadas en condiciones de hipotiroidismo.
- Con los objetivos planteados en los apartados anteriores se pretende entender mejor las anomalías funcionales provocadas por el hipotiroidismo adulto y alcanzar una mejor comprensión de la relación entre la fisiología tiroidea cerebral, la modulación de la neurogénesis y la conducta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas proporcionadas por el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas, que se estabularon en grupos de 3 por jaula. Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura controlada (22-24°C) y con ciclos alternativos de 12h de luz y 12h de oscuridad. Los animales se sometieron a control veterinario siguiendo las normas de la Unión Europea (86/609/EEC) según procedimientos aprobados por el comité ético de la institución.

Se utilizaron animales eutiroides (E), hipotiroideos (H) e hipotiroideos tratados crónicamente con T3 y T4 como terapia de reemplazo hormonal (R). Los diferentes estudios se realizaron a diferentes edades adultas (días postnatales P95, P120, P140 y P150; Figura 6). También se utilizaron animales hipotiroideos con tratamiento hormonal agudo (I y W; Figura 7).

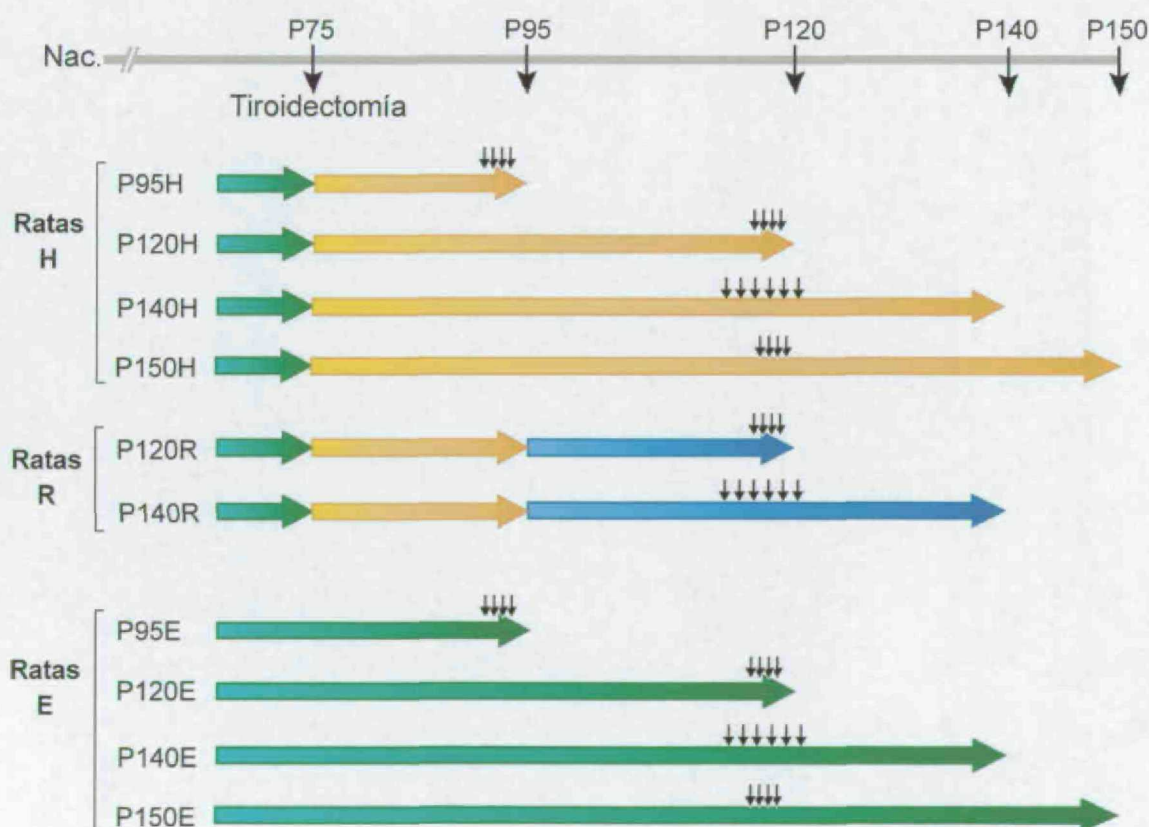


Figura 6. Grupos experimentales: hipotiroideos (H), con reemplazo hormonal (R) y eutiroides (E). El periodo eutiroides de todos los animales se representa en verde, el hipotiroideo en naranja y el tratamiento de reemplazo hormonal en azul. Las flechas negras pequeñas indican las inyecciones de BrdU.

1.1 Hipotiroidismo

La inducción del hipotiroidismo adulto se realizó a P75 en todos los animales mediante tiroidectomía quirúrgica. Los animales eutiroides sufrieron una intervención simulada. Todas las ratas tiroidectomizadas se alimentaron con una dieta baja en yodo desde el día de la intervención (Martínez-Galán y cols., 1997). Este protocolo produce una disminución en las concentraciones de T4 y T3, que alcanzan niveles mínimos aproximadamente 2 semanas después de la operación (Obregón y cols., 1981). Además, la tiroidectomía detiene el crecimiento del animal, por lo que la variación del peso es un buen índice del estado tiroideo del animal. Por ello todos los animales se pesaron 2-3 veces por semana desde el día de la tiroidectomía hasta el día del sacrificio.

La tiroidectomía se realizó bajo una lente de aumento para visualizar con claridad todas las estructuras, según el método descrito por Zarrow (Zarrow y cols., 1964) con algunas modificaciones. Después de anestesiarse al animal con una mezcla de ketamina (5 mg / 100 g peso corporal; Ketalar, Pfizer) y medetomidina (0,01 mg / 100 g peso corporal; Domtor, Pfizer) por inyección i.p., se afeitó y trató con antiséptico la zona ventral del pescuezo (clorhexidina al 0,5% en etanol 70%, Hibimax, AstraZeneca). Después se realizó una incisión a lo largo de la tráquea y se separaron los músculos a su alrededor. La glándula tiroidea consta de dos lóbulos situados a ambos lados de la parte medial de la tráquea. En las porciones posteriores de los lóbulos tiroideos se encuentran alojadas las glándulas paratiroides recubiertas de tejido conectivo. Estas estructuras son amarillentas y se distinguen del tejido tiroideo circundante que es más rojizo. Las paratiroides producen la hormona paratiroidea, que interviene en la regulación de los niveles sanguíneos de calcio. Para evitar problemas relacionados con el metabolismo del calcio, antes de extirpar los lóbulos tiroideos se extrajeron las paratiroides y se colocaron en el músculo cercano donde siguen siendo funcionales. Cada lóbulo tiroideo se disecó tirando de abajo arriba con unas pinzas quirúrgicas estériles. La eventual hemorragia se controló utilizando pequeñas bolas de algodón.

Con el fin de evitar problemas respiratorios e incluso la muerte del animal, se extremaron las precauciones para no dañar el nervio recurrente. Una vez terminada la tiroidectomía, se cosió la incisión con hilo de seda trenzada 3/0 (Suturas Aragón) y se devolvió el animal a su jaula, vigilando su estado hasta después de despertar de la anestesia.

1.2 Tratamiento con hormonas tiroideas

1.2.1 Tratamiento crónico

El tratamiento de reemplazo hormonal (grupos P120R y P140R; Figura 6), se basó en estudios previos (Escobar-Morreale y cols., 1996) con algunas modificaciones, y consistió en la administración de una mezcla fisiológica de T4 y T3 en el agua de bebida ($0,18 \mu\text{g T4/ml}$ y $0,03 \mu\text{g T3/ml}$; Sigma). La solución se preparó diariamente en agua destilada con 0,01% de seroalbúmina bovina (BSA; Sigma) para evitar la degradación de las hormonas. La concentración hormonal en el agua de bebida se calculó en base al volumen ingerido por los animales, para dispensar $2,4 \mu\text{g T4}$ y $0,4 \mu\text{g T3}$ por 100 g de peso corporal por día. Desde el inicio de este tratamiento las ratas se alimentaron con pienso normal.

1.2.2 Tratamientos agudos

El grupo P120W ($n=8$) recibió la mezcla hormonal en el agua de bebida a la misma dosis que en el tratamiento crónico, pero administrada 48h antes de la prueba de nado forzado (ver apartado 7), es decir, 24h antes de la sesión de entrenamiento (Figura 7).

El grupo P120I ($n=9$) recibió 10 veces la dosis utilizada en el tratamiento crónico en una única inyección i.p. de $24 \mu\text{g T4}$ y $4 \mu\text{g T3}$ por cada 100 g de peso corporal. Esta inyección se administró a cada animal 24h antes de realizar la prueba de nado forzado, justo después de la sesión de entrenamiento para la prueba (Figura 7). Para poder comparar los resultados de las pruebas de nado forzado de todas las condiciones estudiadas, y teniendo en cuenta la influencia del posible estrés provocado por la inyección en el comportamiento, el resto de grupos experimentales (P120W, P120E y P120H), recibió una única inyección de salino justo después del entrenamiento.

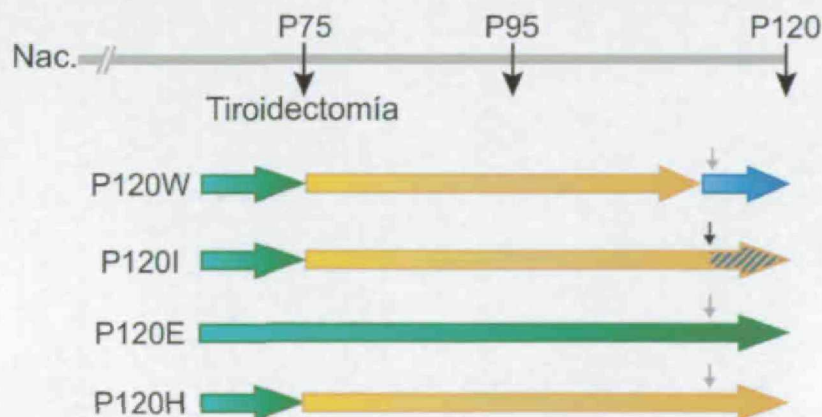


Figura 7. Grupos experimentales con tratamiento agudo de HT. El periodo eutiroides de todos los animales se representa en verde, el hipotiroideo en naranja y el tratamiento con HT en azul. La flecha negra indica la inyección de T4+T3 y las grises las inyecciones de salino.

1.3 Inyecciones de BrdU

El compuesto 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timidina, que se incorpora en el ADN de células en proliferación cuando se encuentran en la fase S del ciclo celular. La BrdU puede ser detectada por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos.

1.3.1 Estudios de proliferación celular

Para analizar las células en proliferación en la ZSG del GD los animales recibieron 4 inyecciones i.p. de 40 mg de BrdU (Sigma) por kg de peso corporal cada 2h y fueron sacrificados 24h después de la primera inyección (Kuhn y cols., 1996; Malberg y cols., 2000; Doetsch y cols., 2002; Reif y cols., 2004). Este protocolo se realizó en los grupos P95E (n=4), P95H (n=4), P120E (n=4), P120H (n=5) y P120R (n=5).

En las células proliferativas de la ZSG del GD la fase S del ciclo celular dura alrededor de 8h y el ciclo entero 25h (Cameron y McKay, 2001). Con este protocolo de administración de BrdU, las células inmunopositivas serán aquellas que hayan entrado en fase S durante las 8h en las que hay disponibilidad de BrdU. De esta manera sólo una pequeña proporción de células postmitóticas podrán ser inmunopositivas para BrdU.

Para evitar la influencia del estrés generado en las pruebas de comportamiento sobre la capacidad proliferativa del GD (Pham y cols., 2005), los animales sometidos a pruebas de comportamiento recibieron las inyecciones de BrdU 3d después de la realización de la última prueba.

Los resultados de estos estudios se corroboraron utilizando técnicas inmunohistoquímicas para visualizar la expresión del antígeno de proliferación celular Ki67 (ver apartado 'Inmunohistoquímica').

1.3.2 Estudios de supervivencia de las células generadas *de novo*

Para analizar la supervivencia de las células generadas en la ZSG se utilizaron dos protocolos diferentes de administración de BrdU (Figura 6):

Protocolo 1: Animales de los grupos E (n=4) y H (n=5) recibieron 4 inyecciones i.p. de 40 mg de BrdU por kg de peso corporal cada 2h a P120 y se sacrificaron 30d más tarde (P150). Este protocolo es igual al utilizado para cuantificar la proliferación, pero con un tiempo de supervivencia

largo. Esto permite comparar los datos de supervivencia obtenidos en estos estudios con los datos de proliferación.

Protocolo 2: Animales de los grupos E (n=3), H (n=3) y R (n=4) recibieron 6 inyecciones i.p. de 40 mg/kg de peso corporal de BrdU cada 12h entre las edades P118 y P120, y se sacrificaron 20 días después de la última inyección (P140). Este protocolo, al marcar una población mayor de células en proliferación, tiene mayor sensibilidad y puede revelar diferencias que podrían pasar inadvertidas con el protocolo anterior.

1.4 Sacrificio de los animales y obtención del tejido

Los animales se anestesiaron igual que para la tiroidectomía quirúrgica. En estado de anestesia profunda, se practicó una incisión a lo largo de todo el abdomen y se apartaron los intestinos con objeto de visualizar la arteria aorta abdominal y su bifurcación en las ilíacas. Utilizando una aguja con heparina al 0,17% (Sigma) se extrajeron 2 ml de sangre de esta arteria que posteriormente se clampó para evitar hemorragias. La sangre heparinizada se centrifugó y el plasma obtenido como sobrenadante se congeló. También se extrajo tejido hepático que se congeló en nieve carbónica inmediatamente después de su extracción. Tanto el plasma como el hígado se utilizaron para las determinaciones hormonales y éste último además para los ensayos de *northern blot* (ver apartado 2.3). Tras abrir la caja torácica el animal se perfundió vía aorta ascendente, utilizando diferentes fijadores según el procesamiento posterior del tejido. Para los estudios inmunohistoquímicos se utilizó como fijador paraformaldehído (Merck) al 4% tamponado en tampón fosfato (PB) 0,1M, pH 7,4. Para los análisis con microscopía electrónica primero se perfundió al animal con 50 ml de solución salina (NaCl 0,9%) y después con una solución fijadora de paraformaldehído al 2% y glutaraldehído (EMS) al 2% tamponada en PB 0,1M pH 7,4.

Tras la perfusión, los animales se decapitaron y los cerebros extraídos se postfijaron por inmersión en el mismo fijador durante 24h a 4°C. Posteriormente los cerebros se lavaron en PB 0,1M y se almacenaron en PB 0,1M con azida sódica al 0,05% (PB-azida) a 4°C.

2. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

2.1 Determinación de las concentraciones de hormonas tiroideas

Esta parte del estudio se realizó en colaboración con el grupo de los Prof. Gabriela Morreale de Escobar y Francisco Escobar del Rey, del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

2.1.1 Síntesis de trazadores (T4 y T3 marcadas radiactivamente)

Las HT radiactivas se sintetizaron en el laboratorio de los Prof. Morreale y Escobar, pues son necesarias hormonas radiactivas de muy alta actividad específica (3000-1500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) para los ensayos posteriores de radioinmunoanálisis (RIA) y como trazadores para cuantificar la recuperación de HT en el proceso de extracción. El $[^{125}\text{I}]$ se utiliza para el marcaje de T3 y T4 para el RIA. Para usar HT como trazadores durante la extracción y poder distinguirlas, la T3 se marca con $[^{125}\text{I}]$ y la T4 con $[^{131}\text{I}]$.

La T4 marcada se sintetizó a partir de T3 y la T3 a partir de 3,5-T2, siguiendo el método descrito por Weeke y Orskov (Weeke y Orskov, 1973). El yoduro radiactivo utilizado se oxidó a yodo naciente mediante cloramina T y se incorporó en posición 5' ó 3' del grupo fenilo del sustrato. Los productos del marcaje se separaron por cromatografía de exclusión según la modificación de Kjeld y cols. (Kjeld y cols., 1975) utilizando columnas de Sephadex G-25 fine (Roche).

2.1.2 Extracción de hormonas tiroideas de plasma e hígado

En todos los animales estudiados se realizaron medidas de las concentraciones de T3 y T4 en plasma e hígado.

En el proceso de extracción y purificación de HT se eliminaron lípidos y proteínas ya que pueden interferir con el RIA. En este proceso se utilizó el método de Gordon y cols. (Gordon y cols., 1982), sustancialmente modificado (Morreale de Escobar y cols., 1985). Las muestras se homogenizaron añadiendo 10 volúmenes de metanol. Después se añadieron 2000 cpm de $[^{131}\text{I}]$ -T4 y $[^{125}\text{I}]$ -T3 como trazadores internos de la recuperación de cada yodotironina en cada muestra. Las HT se extrajeron en una mezcla de cloroformo y metanol (2:1) y se pasaron a una fase acuosa añadiendo 0,25 volúmenes de Cl_2Ca al 0,005%. Los extractos obtenidos se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en columnas de resina Dowex. Las HT se recogieron por elución con ácido acético al 70%. La radiactividad de la fracción resultante se cuantificó con un contador gamma para calcular la recuperación individual de cada hormona en cada una de las

muestras analizadas. El eluido se concentró por evaporación a sequedad y se resuspendió en tampón de RIA (PB 0,04M pH 8 con BSA al 0,2 % y mertiolato 0,6 mM). Este extracto se guardó congelado hasta su análisis posterior mediante RIA.

2.1.3 Determinación de T3 y T4 en extractos de plasma e hígado (RIA)

Para los RIA de T3 y T4 se utilizó el método de Weeke y Orskov (Weeke y Orskov, 1975) modificado para tejido de rata (Obregón y cols., 1978; Morreale de Escobar y cols., 1985; Morreale de Escobar y cols., 1994), usando anticuerpos específicos (Ruiz de Oña y cols., 1991).

Cada muestra se ensayó por duplicado y a dos diluciones diferentes, añadiendo a cada ensayo 100 µl de tampón de RIA con 6000 cpm de [¹²⁵I]-T4 ó [¹²⁵I]-T3 y 100 µl del antisuero específico (en una dilución 1/300000 para T4 y 1/150000 para T3). Después de 12-24h de incubación, se añadieron 1,5 ml de tampón de RIA con 90 mg de polietilenglicol 6000 y 45 µl de suero bovino. Las muestras se precipitaron por centrifugación y se contó la radiactividad del precipitado.

Se prepararon curvas patrón de T4 y T3. La curva patrón del RIA de T4 cubrió el rango de 2,5 a 320 pg, siendo el límite de detección de 2,5 pg/tubo. La curva patrón del RIA de T3 cubrió el rango de 1,5 a 100 pg, siendo el límite de detección de 1,5 pg/tubo.

Las concentraciones de cada hormona en la muestra inicial se calcularon teniendo en cuenta el peso de la muestra original homogeneizada, la recuperación de los trazadores durante el proceso de extracción y el volumen de cada alícuota, y se expresaron en ng por ml de plasma o en ng por mg de tejido.

2.2 Determinación de la concentración de corticosterona en plasma

Para medir los niveles de corticosterona plasmática se utilizó un kit comercial de radioinmunoensayo en fase sólida (Coat-A-Count, Diagnostics Products Corporation), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit contiene tubos de propileno con anticuerpos anti-corticosterona adheridos en las paredes interiores en una concentración constante. En estos tubos se incubaron 50 µl del plasma y 1 ml de [¹²⁵I]-corticosterona (proporcionada también por el kit comercial) durante 2h. Tras decantar todo el líquido de la columna, se midió la radiación emitida por la fracción de corticosterona marcada unida a los anticuerpos en un contador gamma. La concentración de corticosterona en la muestra se obtuvo según una curva de calibración que se calculó por la competición de la corticosterona marcada radiactivamente con cantidades conocidas

de corticosterona fría. Cada muestra se ensayó por duplicado. Este kit tiene una sensibilidad de 5,9 ng/ml. Esta determinación de corticosterona se realizó en animales de los grupos P120E (n=4), P120H (n=4) y P120R (n=5).

2.3 Análisis del ARN mensajero de desyodasa 1 en hígado (northern blot)

La expresión de la enzima desyodasa 1 (D1) varía con el estado tiroideo. Así, para disponer de un método alternativo y complementario de caracterización del estado tiroideo de los animales, se analizó la expresión del ARN mensajero (ARNm) de D1 en tejido hepático de varias muestras de cada grupo experimental. El tejido se disecó antes de la perfusión y se conservó congelado a -80°C (ver apartado 1.4). El ARN total se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante, se cuantificó espectrofotométricamente a 260nm y se guardó a -80°C hasta su uso.

Se utilizaron 10 µg de ARN total que se fraccionaron en geles de formaldehído-agarosa y se transfirieron a membranas de nailon (Nytran, Schleicher & Schuell) usando técnicas estandarizadas (Sambrook y cols., 1989).

El ARNm de D1 se detectó con una ribsonda complementaria específica que consta de 329 pares de bases, abarcando desde el nucleótido 601 al 929 del ADNc de la D1 de rata (Acc N X57999). Esta sonda se marcó radiactivamente con ³²P-desoxi-CTP utilizando el kit rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech), según las instrucciones del fabricante.

La sonda se incubó con las membranas a 65°C durante 18h en solución de hibridación (7% SDS, 79mM NaH₂PO₄, 170mM Na₂HPO₄) a una concentración de 11 x 10⁶ cpm/ml. Después de la hibridación y los lavados, la membrana se expuso a una película autorradiográfica durante 12h a -80°C.

El tamaño de la banda específica para D1 se obtuvo por una línea de regresión utilizando una representación semilogarítmica de los tamaños del patrón de pesos moleculares frente a la distancia migrada en el gel de electroforesis. Para llevar un control de carga del ARN, se lavó la sonda de D1 de las membranas y éstas se rehibridaron con una sonda específica del ARN ribosómico de 18S. Las autorradiografías se escanearon y la densidad óptica de cada banda se cuantificó con el programa Scion Image (Scion Corporation).

3. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

3.1 Obtención del tejido

El cerebro fijado (ver apartado 1.4) se cortó en secciones coronales de 50 μm de grosor, utilizando un vibratomo (VT-1000S, Leica). Las secciones se recogieron en PB-azida y se almacenaron a 4°C. El hipocampo dorsal (de -2.5 a -4.5 mm desde bregma) se cortó seriado en 6 tubos. Para estudiar la distribución y el número de las células inmunopositivas para cada anticuerpo utilizado se utilizó una serie completa de secciones de cada animal. Para los estudios con la tinción histológica de Nissl (ver apartado 5) se utilizó una de las series de una muestra representativa de cada grupo experimental.

3.2 Procedimiento

El protocolo se realizó en flotación en placas (Nunc o Falcon) de 6 o 24 pocillos (para lavados o incubaciones con anticuerpos, respectivamente). Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación, excepto cuando se especifican otras condiciones. Todas las muestras para un mismo experimento se procesaron simultáneamente para minimizar las variaciones de inmunotinción.

Como primer paso, en todos los casos las secciones se lavaron 5x5 min en PBS (tampón fosfato salino: tampón fosfato 0,05 M conteniendo NaCl al 0,9%, pH 7,4).

3.2.1 Inmunohistoquímica

Las peroxidasas endógenas se bloquearon 15 min con metanol al 10% y H_2O_2 al 3% en PBS. Después de lavar esta solución, las secciones de tejido se incubaron durante 2h en la solución de bloqueo (4% BSA y 0,1% tritón X-100 en PBS con 5% de suero y 0,1M lisina). Posteriormente se incubaron durante toda la noche, a 4°C con el anticuerpo primario (diluido en PBS con 4% BSA, 0,1% tritón y 1% de suero) y al día siguiente con el secundario biotinilado (diluido en PBS con 4% BSA, 0,1% tritón y 5% de suero) durante 1h. Después de los lavados, las secciones se incubaron con avidina-biotina-peroxidasa (ABC Elite kit, Vector) en PBS con 0,1% tritón durante 1h. El revelado del color se desarrolló por incubación en PBS con H_2O_2 al 0,01% y diaminobenzidina (Sigma) 0,5mg/ml, durante un tiempo variable en función del anticuerpo primario utilizado. Las secciones se montaron sobre portaobjetos gelatinizados con ayuda de pinceles y se secaron al aire.

Las preparaciones se deshidrataron en alcohol etílico en porcentaje creciente (50%, 70%, 96%, absoluto), se aclararon en xilol y se cubrieron con medio de montaje DePex (Serva).

3.2.2 Inmunofluorescencia

Las secciones de tejido se incubaron 2h en la solución de bloqueo y posteriormente durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Al día siguiente se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (sin tritón) durante 1h y posteriormente con el anticuerpo fluorescente o cromóforo (sin tritón) durante 3h. Para visualizar los núcleos celulares, las secciones se contratiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Sigma; 100 ng/ml en PBS) 30 min. Las secciones se montaron sobre portaobjetos, se cubrieron con mowiol y se almacenaron a 4°C en oscuridad.

Para la detección de BrdU, las secciones de tejido se permeabilizaron previamente con HCl 2N a 37°C durante 30 min para que las moléculas de BrdU incorporadas en el ADN sean accesibles a los anticuerpos. Este tratamiento se neutralizó con tampón borato 0,1M pH 8,5 2x5 min. Después de equilibrar las secciones en PBS se continuó con el procedimiento descrito arriba.

3.3 Anticuerpos utilizados

Anticuerpos y cromóforos	Especie	Casa comercial	Dilución de uso
BrdU	Ratón	Dako	1:200
Ki67	Ratón	Novocastra	1:100
DCX	Cabra	Santa Cruz	1:200
Caspasa 3 activada	Conejo	Cell Signaling	1:500
Secundarios biotinilados	Caballo anti-ratón Conejo anti-cabra Cabra anti-conejo	Vector	1:200
Alexa 488	Ratón	Molecular Probes	1:2000
Alexa 546 estreptavidina	No aplicable	Molecular Probes	1:2000

3.4 Método TUNEL

Para visualizar células apoptóticas, uno de los métodos utilizados fue el TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling). Esta técnica consiste en detectar el ADN fragmentado por adición de nucleótidos marcados por acción de la enzima transferasa terminal en los extremos 3'-OH libres. Las secciones de tejido se permeabilizaron primero con una mezcla de alcohol etílico y ácido acético glacial (2:1) y luego con tritón X-100 al 0,5% en PBS. Después se utilizó el kit Apoptag (Chemicon), que incluye la enzima transferasa terminal y los nucleótidos marcados con digoxigenina. Esta molécula se detectó con un anticuerpo específico acoplado a fosfatasa alcalina (Roche). El revelado del color se desarrolló utilizando el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT:BCIP (nitro blue tetrazolium chloride y 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; 9:7; Roche).

3.5 Análisis cuantitativo de células inmunopositivas

La cuantificación se realizó siguiendo una versión modificada del principio del fraccionador (Williams y Rakic, 1988). Para evitar sesgos, cada sección de tejido se cuantificó sin conocer el grupo experimental al que pertenecía. Se contaron las células inmunopositivas en 6 secciones por animal, todas pertenecientes a la misma serie, analizando ambos hemisferios cerebrales. Las secciones se muestrearon sistemáticamente en niveles dorsales del GD (de -2.5 a -4.5 desde bregma, ver sección 3.1). Se estudió toda el área subgranular y toda la profundidad de cada sección. Para evitar sesgos por sobreestimación en el recuento, se excluyeron las células marcadas en el plano focal superior. Se consideraron todas las células localizadas en la ZSG y aquellas que la tocaban o estaban situadas a menos de 2 cuerpos celulares de esta capa. Se define como "unidad proliferativa" o clon a 2 o más núcleos adyacentes marcados con un anticuerpo de proliferación (BrdU o Ki67). El número total de células o de unidades proliferativas inmunopositivas se calculó multiplicando la suma de los valores obtenidos en cada sección por 6 (número de series que contenía la región analizada). Los recuentos se realizaron directamente en un microscopio óptico (Nikon Elite) a 40x. Para cuantificar con precisión el número de células BrdU+ por unidad proliferativa en todo el grosor del corte, en los estudios de proliferación, se realizó un análisis tridimensional utilizando microscopía confocal (Leica TCS SP2).

Los estudios se realizaron en 3-5 animales por condición experimental. En experimentos previos se utilizaron 5 animales por condición y se estableció que para obtener una varianza

homogénea entre los grupos y alcanzar la significación estadística se requería estudiar una muestra mínima de 3 animales.

4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Esta parte del estudio se realizó durante mis estancias breves financiadas por la beca FPI en el grupo del Prof. José Manuel García Verdugo de la Universidad de Valencia.

4.1 Inclusión del tejido y obtención de secciones

El cerebro fijado se cortó en secciones coronales de 200 μm de grosor, utilizando un vibratomo (VT-1000S, Leica). Las secciones se recogieron en PB-azida y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento.

Las secciones de tejido de 200 μm se postfijaron en tetróxido de osmio al 2% (EMS) en PB 0,1M durante 90 min en oscuridad con agitación suave. Después de lavar con agua y deshidratarlas con concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%), se contrastaron con acetato de uranilo al 2% en etanol al 70%, 2h a 4°C. Se continuó la deshidratación (96%, absoluto) y después las secciones se trataron con óxido de propileno, para facilitar la penetración de la resina. Las secciones se incluyeron en araldita (Durcupan; Fluka) por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación fuerte. Después, las secciones impregnadas de araldita se colocaron entre 2 láminas de acetato, y se incubaron en estufa a 65°C durante 4 días para su polimerización. Las secciones se recortaron y se pegaron en tacos de resina para cortarlas con el ultramicrotomo. Tras retallar la pieza con cuchilla de vidrio, se realizaron secciones semifinas (1,5 μm) con cuchilla de diamante que se montaron en portaobjetos gelatinizados. Después de analizar las secciones semifinas con microscopía óptica (ver apartados 5.2 y 6.2), se escogieron secciones representativas de los diferentes niveles y se arrancaron de los portaobjetos para realizar secciones ultrafinas (0,05 μm). Éstas se recogieron en rejillas de cobre y se contrastaron con una solución de citrato de plomo (Reynolds 65) para su estudio por microscopía electrónica.

5. TINCIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO MEDIANTE TÉCNICA DE NISSL

Esta técnica revela la citoarquitectura del tejido al permitir el estudio de la distribución y morfología de los somas celulares.

5.1 Secciones de vibratomo

Una serie completa de cada animal de una muestra representativa de cada grupo experimental (ver apartado 3.1) se utilizó para el estudio de la citoarquitectura por Nissl. Las secciones de tejido se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar al aire. El procedimiento utilizado es el descrito por Noraberg y cols. (Noraberg y cols., 1999), con algunas modificaciones. Las preparaciones se sumergieron en etanol al 70% durante 12h. Después se lavaron en agua dos veces durante 5 min, y se tiñeron con azul de toluidina al 0,1% (Merk) en una solución de Na_2HPO_4 al 1,4% (Riedel Haën) y ácido cítrico al 1,3% (Merck) pH 4 durante 15 min. Se eliminó el exceso de colorante lavando con agua. Posteriormente, las preparaciones se deshidrataron en etanol a concentraciones crecientes (70%, 90% y 99%) durante 2 min. Tras la deshidratación, se clarificaron en xileno 5 min, se rehidrataron durante 2 min en alcohol al 99% y al 96% y finalmente en agua durante 5 min. Después se procedió a la tinción final de las secciones de tejido con azul de toluidina durante 15 min, se aclararon con agua y se deshidrataron gradualmente (etanol al 50%, 70% y 96% durante 15 seg, 30 seg, y 1,5 min, respectivamente). La tinción se diferenció en etanol al 99%, según criterio propio. Después las secciones de tejido se clarificaron en xilol y posteriormente se recubrieron con DePex.

5.2 Secciones semifinas

Las preparaciones se tiñeron 1-2 min en una solución acuosa de azul de toluidina al 1% y borax al 1% (TAAB) sobre una placa de histología a 60°C. Después se eliminó el exceso de colorante lavando con agua.

Estos cortes no se deshidrataron ni se cubrieron porque después de analizarlos con microscopía óptica, algunos de ellos se arrancaron para su procesamiento y análisis por microscopía electrónica (apartado 4.3).

6. ANÁLISIS DE LA ANATOMÍA Y CITOARQUITECTURA DEL GIRO DENTADO

Para realizar estos estudios las diferentes regiones de cerebro se identificaron con la ayuda del atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986).

6.1 Anatomía del giro dentado

Primero se estudió la anatomía general del GD del hipocampo. Para ello una serie completa de secciones de 50 μm cortadas en vibratomo y teñidas con la técnica de Nissl se analizó con ayuda de un microscopio óptico (Nikon Eclipse) acoplado a una cámara digital (Nikon Dn100).

6.2 Citoarquitectura del giro dentado

También se analizó la distribución y morfología de los somas celulares en la capa granular del GD en las secciones semifinas teñidas con la técnica de Nissl por microscopía óptica. En estas mismas secciones se realizó un análisis cualitativo de la proporción de núcleos picnóticos en diferentes condiciones experimentales (P95E, P95H, P120E y P120H, en todos los casos $n=3$) para complementar otros estudios realizados de la caracterización de la muerte celular en esta región.

La microscopía electrónica de transmisión permite distinguir finos detalles para diferenciar la tipología celular, lo que permite cuantificar distintos tipos celulares. Utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEOL-JEM1010) se estudió la morfología y la disposición de las células de la capa granular en distintos grupos experimentales (P95 y P120, E y H).

6.3 Volumen del giro dentado

El volumen del GD del hipocampo se estimó según el método de Cavalieri en las mismas secciones en las que se habían cuantificado las células BrdU+, contrateñidas con DAPI. Para ello se utilizó un microscopio de fluorescencia (Olympus) motorizado acoplado a una cámara digital y a un ordenador con un programa específico para el método de Cavalieri (CAST, Olympus Corporation). Se analizaron los dos hemisferios cerebrales en una serie completa (6 secciones) por animal (grupos

P95, $n=6$; grupos P120, $n=3$). Los datos se obtuvieron por métodos estereológicos insesgados (Sousa y cols., 1998).

7. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

Los animales para estudios de comportamiento se manipularon diariamente durante los 3d anteriores al comienzo de las pruebas, para que se habituaran a la manipulación. Ésta consistió en el transporte de los animales desde el estabulario a la habitación de experimentación, donde permanecieron 2 min en las manos del experimentador. Todos los estudios se realizaron entre las 08.00 y las 13.30h. Para estos estudios se utilizaron 7-11 animales por condición experimental, que es el número mínimo de animales necesario para alcanzar significación estadística. En todos los casos, los experimentos se realizaron sin que el experimentador conociese el estado tiroideo de los animales.

7.1 Prueba de nado forzado

Este test se utiliza para evaluar un estado de ánimo semejante a la tendencia a la depresión en roedores. Por lo tanto, en adelante y en este contexto, se denominará comportamiento de tipo depresivo.

7.1.1 Desarrollo de la prueba

El protocolo utilizado se basa en el descrito por Porsolt y cols. (Porsolt y cols., 1977) con pequeñas modificaciones. El primer día se realizó el entrenamiento, y al día siguiente se llevó a cabo la prueba.

Durante el entrenamiento, los animales se depositaron de manera individual durante 10 min en un tanque cilíndrico de metacrilato (60 cm de alto y 25 de diámetro) lleno de agua del grifo a 23-25°C hasta una altura de 45 cm, de manera que la rata en flotación no tocaba el fondo con sus patas traseras. Después, los animales se sacaron del tanque y se secaron antes de devolverlos a sus jaulas. Este nado forzado representa una situación de estrés moderado para los animales. Al día siguiente, las ratas se volvieron a introducir en el cilindro para realizar la prueba de 5 min de duración. En todo momento el tanque se mantuvo lo más limpio posible, cambiándose el agua después de 2 sesiones de 10 min o de 4 sesiones de 5 min. Las heces se recogieron después de cada sesión.

7.1.2 Evaluación del comportamiento de tipo depresivo

En ambas sesiones (entrenamiento y prueba), la conducta de los animales se grabó con una videocámara situada 80 cm por encima del tanque. Se contabilizó el tiempo de inmovilidad y de nado de cada animal. El comportamiento de nado se define como reacciones de fuga, es decir, manotear vigorosamente con las 4 patas, nadar en círculo, bucear e intentar escalar las paredes del tanque. La inmovilidad se define como flotar y realizar los movimientos imprescindibles para mantenerse a flote. El tiempo de inmovilidad en esta prueba se considera como un modelo de respuesta conductual al estrés sin posibilidad de escape (*inescapable*). Se considera que el aumento del tiempo de inmovilidad se correlaciona con un mayor estado de tipo depresivo del animal.

7.2 Reconocimiento de un objeto nuevo

Esta tarea, originalmente descrita por Ennaceur y Delacour (Ennaceur y Delacour, 1988), se basa en la tendencia de los roedores a explorar más activamente un objeto desconocido que uno familiar. Este test evalúa la memoria de reconocimiento visual del animal, un tipo de memoria explícita que depende del hipocampo.

7.2.1 Desarrollo de la tarea

Tras la habituación a la manipulación, se realizó la sesión de entrenamiento en una caja de campo abierto (60 x 62 x 50 cm de altura) con el suelo cubierto de viruta. Durante el entrenamiento se colocaron 2 objetos en 2 esquinas adyacentes de la caja a 10 cm de las paredes, y se introdujo al animal para que explorase durante 5 min ambos objetos. Un día después del entrenamiento, uno de los objetos se reemplazó por uno nuevo diferente y se analizó la conducta exploratoria durante 5 min (Figura 8).

Después de cada sesión los objetos se limpiaron minuciosamente con ácido acético al 0,1% para eliminar rastros, se retiraron las heces y la viruta se removió para evitar que un olor específico permaneciera en un lugar determinado y modificase la conducta exploratoria del animal. La localización de los objetos, tanto familiares como el nuevo, se alternó entre los distintos animales durante las sesiones de entrenamiento y test. De esta manera se reducen los potenciales sesgos debidos a preferencias de los animales por lugares u objetos concretos.

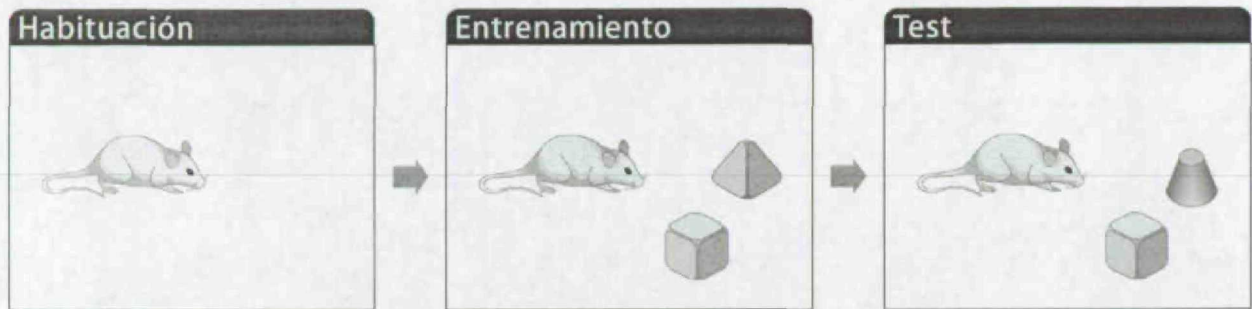


Figura 8. Esquema de las sesiones para el test de reconocimiento de un objeto nuevo. Los animales se habituaron durante 3 días a la manipulación, se entrenaron explorando los objetos al día siguiente y realizaron la prueba con el objeto novedoso el quinto día.

7.2.2 Evaluación de la actividad exploratoria

El tiempo de exploración de cada objeto se cronometró *in situ*. La exploración de un objeto se define como olfatearlo a menos de 2 cm de distancia y/o tocarlo con el hocico y/o apoyarse en él. El reconocimiento del objeto previamente explorado o familiar se refleja en la preferencia por explorar el objeto novedoso. Para analizar esta preferencia teniendo en cuenta las posibles diferencias en el tiempo total de exploración, se calculó el índice de discriminación (I_d):

$$I_d = \frac{t_n - t_f}{t_n + t_f}$$

donde t_n es el tiempo de exploración del objeto novedoso y t_f el tiempo de exploración del objeto familiar. Este índice refleja la tendencia del animal por explorar el objeto novedoso frente al familiar.

7.3 Pruebas de condicionamiento por miedo

En esta prueba se evalúa la adquisición y consolidación de memorias emocionales. Durante el condicionamiento, el animal se expone a un estímulo inocuo (un contexto o un sonido, estímulos condicionados) asociado a un estímulo aversivo (en este caso, una descarga eléctrica, que es un estímulo incondicionado). Esta asociación hace que el animal aprenda a responder al estímulo condicionado en ausencia del estímulo aversivo. La respuesta del condicionamiento al contexto depende del funcionamiento del hipocampo y de la amígdala (tiene componentes de memoria explícita e implícita), mientras que la respuesta del condicionamiento al sonido depende sólo de la

integridad de la amígdala (memoria implícita; Phillips y LeDoux, 1992). El protocolo utilizado permite evaluar la respuesta a ambos condicionamientos en los mismos animales.

7.3.1 Instrumentación

Estas pruebas se realizaron en un dispositivo de condicionamiento pavloviano, que consta de una caja de observación (30 x 37 x 25 cm de altura) situada en el interior de una cámara de aislamiento. La caja tiene 3 paredes de metal y una transparente con una trampilla por donde se introduce al animal. El suelo de la jaula consiste en 20 varillas de acero que conducen la corriente generada por un generador de choques (modelo LI100-26 Shocker, LETICA IC). Debajo se sitúa una bandeja extraíble con viruta. La cámara de atenuación de ruidos es metálica excepto su pared frontal, que es de plexiglás rojo para facilitar la observación de la conducta del animal. Esta cámara alberga un sistema de ventilación que emite un sonido monótono de 68dB y una bombilla de luz blanca de 20W. De esta manera el módulo se encuentra aislado acústica y lumínicamente del exterior.

7.3.2 Condicionamiento

Como estímulos inocuos condicionados se utilizaron el contexto (la jaula de observación) y un sonido (de 80dB a 2000 Hz), y como estímulo aversivo incondicionado una descarga eléctrica (0,40 mA de intensidad, corriente continua).

El condicionamiento para ambos estímulos (contexto y sonido) se realizó en el mismo experimento. Para realizar este entrenamiento las ratas se expusieron a la caja de condicionamiento durante 160 s en los que el animal la exploró libremente. Seguidamente sonó el tono de forma continuada durante 20 s y en el último segundo se provocó la descarga eléctrica. Este procedimiento se repitió dos veces más con un intervalo de 40 s (Figura 9). Las ratas se extrajeron del dispositivo de condicionamiento 30 s después de la última descarga y se devolvieron a sus jaulas de origen. El tiempo total de duración de cada sesión fue de 5,5 min. La jaula de observación se limpió con una solución de ácido acético al 0,1% antes y después de cada sesión, se retiraron las heces y se cambió la viruta.

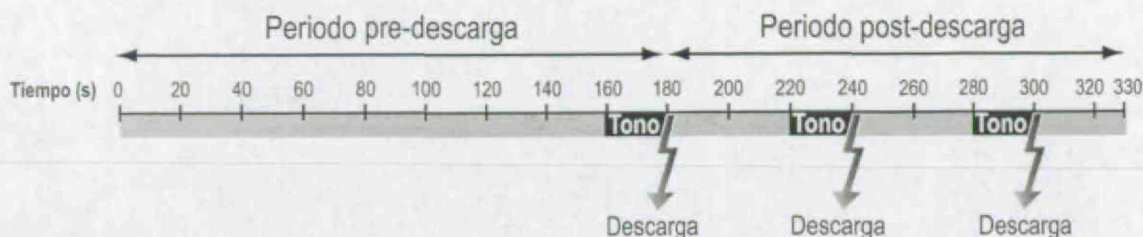


Figura 9. Esquema del protocolo para el condicionamiento por miedo. Los animales recibieron tres estímulos sonoros y tres descargas eléctricas con un intervalo entre ellas de 60 s.

El comportamiento de los animales se registró durante toda la sesión (5,5 min), analizándose por separado los 3 min anteriores a la primera descarga (periodo pre-descarga) y los 2,5 min restantes (periodo post-descarga). El comportamiento se definió, usando un procedimiento de muestreo del tiempo, como activo o inmóvil cada 2 s. La respuesta de inmovilidad (*freezing*) se define como la ausencia de movimientos excepto aquellos imprescindibles para respirar. El tiempo de inmovilidad es un buen indicador del grado de miedo que provoca el estímulo aversivo incondicionado (la descarga eléctrica). Para realizar el análisis estadístico, los datos se transformaron a un porcentaje del total del tiempo de observación.

7.3.3 Evaluación del condicionamiento por miedo al contexto

Se realizaron varios ensayos para evaluar la respuesta de condicionamiento al contexto a lo largo del tiempo: a las 24h del condicionamiento (test 24h), a los 7 días (test 1 semana) y a los 21 días (test 3 semanas). Durante la prueba contextual las ratas se volvieron a situar en la cámara de condicionamiento con su contexto original y en ausencia de descarga eléctrica durante 8 min y se registró el comportamiento del animal durante este periodo siguiendo el procedimiento explicado arriba.

7.3.4 Evaluación del condicionamiento por miedo al sonido

También se realizó un seguimiento del condicionamiento al sonido, 48h (test 48h), 8 días (test 1 semana) y 22 días (test 3 semanas) después del condicionamiento. Durante esta prueba, las ratas se situaron en un contexto nuevo, cambiando el entorno en el que se realizó el condicionamiento y las pruebas de contexto. Después de un periodo inicial de 3 min, sonó el tono de condicionamiento

durante 5 min. El comportamiento del animal se registró durante toda la prueba, distinguiendo ambos periodos (pre y post-sonido).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los resultados se expresan como media \pm error estándar. El nivel de significación estadística se estableció en $P \leq 0,05$. Las comparaciones estadísticas entre grupos y edades se realizaron con el programa estadístico SPSS (SPSS Inc.). Para establecer comparaciones entre 2 grupos se utilizó la prueba T de Student y entre 3 grupos el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Cuando el ANOVA indicó un efecto significativo del factor estado tiroideo, se realizaron los análisis *a posteriori* apropiados (de Tukey o DMS).

El análisis de la distribución de las unidades proliferativas en función del número de células se realizó con tablas de contingencia y pruebas asintóticas no paramétricas χ^2 . La comparación de las diferentes categorías (2 células frente a 2 células, 3 células frente a 3, etc) entre los distintos grupos experimentales se realizó con un análisis de rangos y pruebas U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1. Estudio del estado tiroideo

Para comprobar el estado tiroideo de los diferentes grupos de animales (eutiroides, hipotiroides e hipotiroides con reemplazo hormonal) y así establecer la validez de nuestro modelo experimental, se analizaron diversos parámetros que se detallan a continuación.

1.1.1. Peso corporal final y ganancia de peso

Una buena indicación del estado tiroideo de los animales es la evaluación de la ganancia de peso corporal con el tiempo, ya que el hipotiroidismo interfiere con el crecimiento del animal. Por tanto, se realizó un seguimiento del peso de todos los animales desde la tiroidectomía hasta su sacrificio.

Todos los grupos de ratas hipotiroideas (P95H, P120H y P140H) presentaban una disminución significativa tanto en la ganancia de peso corporal desde la operación hasta el día de sacrificio, como en el peso corporal final respecto a los correspondientes grupos eutiroides (en todos los casos, $P < 0,001$; Tabla 1). El tratamiento con HT (ratas P120R y P140R) indujo la recuperación de ambos parámetros (Tabla 1).

	Peso corporal (g)	Ganancia de peso (g)	T4 plasmática (ng/ml)	T3 plasmática (ng/ml)	T4 hepática (ng/g)	T3 hepática (ng/g)
P95E	396 ± 13	62,4 ± 1,1	33,16 ± 2,89	0,44 ± 0,04	24,38 ± 3,35	2,82 ± 0,14
P95H	319 ± 10***	1,9 ± 1,8***	0,71 ± 0,08***	0,05 ± 0,01***	0,96 ± 0,10***	0,19 ± 0,03***
P120E	417 ± 15	88,2 ± 4,6	17,18 ± 1,38	0,34 ± 0,03	28,10 ± 1,33	3,57 ± 0,30
P120H	301 ± 14***	20,7 ± 2,6***	1,05 ± 0,23***	0,07 ± 0,03***	1,56 ± 0,19***	0,62 ± 0,08***
P120R	393 ± 22 ^{NS}	94,3 ± 2,0 ^{NS}	22,24 ± 1,68*	0,23 ± 0,01**	25,34 ± 1,84 ^{NS}	2,98 ± 0,31 ^{NS}
P140E	411 ± 18	113,3 ± 9,3	15,81 ± 1,71	0,37 ± 0,04	28,99 ± 1,01	3,75 ± 0,31
P140H	302 ± 16***	28,9 ± 14,4***	0,84 ± 0,08***	0,06 ± 0,02***	0,93 ± 0,02***	0,35 ± 0,12***
P140R	406 ± 16 ^{NS}	122,3 ± 18,9 ^{NS}	22,85 ± 3,40 ^{NS}	0,27 ± 0,03 ^{NS}	27,08 ± 2,57 ^{NS}	3,53 ± 0,45 ^{NS}

Tabla 1. Estudio del estado tiroideo de los animales experimentales. E, eutiroides; H, hipotiroides; R, con tratamiento de reemplazo hormonal. Los resultados se muestran como la media ± error estándar. Diferencias respecto al grupo E: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS, no significativo.

1.1.2. Concentraciones de hormonas tiroideas

Las concentraciones hormonales determinadas en plasma e hígado en los grupos eutiroides confirmaban los valores descritos previamente para ratas Wistar macho de esta edad (Ruiz-Marcos y cols., 1988). En los grupos de ratas hipotiroideas (P95H, P120H y P140H) los valores de T3 y T4 se encontraban considerablemente disminuidos respecto a los valores de las ratas eutiroides (en todos los casos, $P < 0,001$; Tabla 1). El tratamiento de ratas hipotiroideas con HT (grupos P120R y P140R) indujo un aumento considerable en los valores de T3 y T4 en plasma e hígado. Tras 25d de reemplazo hormonal (P120R) los valores de HT en hígado alcanzaron niveles eutiroides, mientras que en plasma, aunque los valores hormonales estaban dentro del rango eutiroides, la T4 se encontraba ligeramente elevada ($P < 0,05$) y la T3 disminuida ($P < 0,05$) respecto a las ratas controles eutiroides (Tabla 1). Tras 45d de reemplazo hormonal (P140R) los valores de HT en hígado y plasma no diferían de los del grupo P140E.

Los animales tiroidectomizados con concentraciones de T3 y T4 plasmáticas y hepáticas bajas ($T4 < 6\%$ y $T3 < 20\%$ de los niveles de las ratas eutiroides) y una ganancia de peso corporal inferior a 15g en los 20d posteriores a la tiroidectomía se consideraron hipotiroideos (Ruiz-Marcos y cols., 1980; Obregón y cols., 1981). Sólo 4 animales tiroidectomizados se descartaron siguiendo estos criterios.

1.1.3. Desyodasa 1 hepática

Otra prueba del estado tiroideo de los animales la proporciona el estudio de la expresión de la enzima desyodasa 1 (D1) hepática. El gen de D1 está regulado positivamente por T3 a nivel transcripcional, por lo que en condiciones de hipotiroidismo se produce una disminución de los niveles de ARN mensajero (ARNm) de este gen (Berry y cols., 1990).

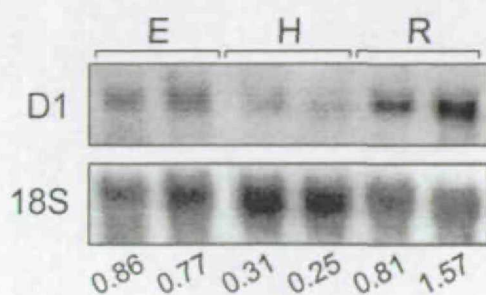


Figura 10. Northern blot para desyodasa 1 en animales con distinto estado eutiroides. Los números inferiores representan la intensidad de señal de la hibridación corregida por la intensidad del control de carga (ARNr 18S). El ARNm disminuye en los animales hipotiroideos (H) respecto a los eutiroides (E), y se recupera en los tratados (R).

Los niveles de ARNm de D1 en hígado se analizaron en el grupo P120 con la técnica de "northern blot". El ARNm de D1 estaba disminuido en las ratas P120H respecto a las ratas eutiroides. Estos niveles se recuperaron en los animales hipotiroideos con reemplazo hormonal, incluso por encima de los niveles eutiroides (P120R; Figura 10).

Todos estos resultados muestran que nuestro modelo experimental es adecuado para evaluar in vivo los efectos del estado tiroideo sobre la neurogénesis adulta y sus posibles implicaciones funcionales.

1.2 Concentraciones plasmáticas de corticosterona

Las variaciones en las concentraciones de corticosterona plasmática se han relacionado con cambios en la neurogénesis adulta en el hipocampo y con alteraciones del comportamiento (Cameron y Gould, 1994; Lupien y McEwen, 1997). Para descartar que los resultados obtenidos en los distintos estudios se debieran a variaciones en las concentraciones de esta hormona relacionadas con el estado tiroideo, se determinaron las concentraciones plasmáticas de corticosterona en el grupo experimental P120.

Las concentraciones de corticosterona en plasma en los animales P120H se encontraban significativamente disminuidas respecto a las de los animales P120E (en ng/ml, P120E= 406 ± 60 ; P120H= 219 ± 50 , $P < 0,05$). El tratamiento de los animales hipotiroideos con HT elevó los valores, por encima de los detectados en animales eutiroides (P120R= 606 ± 27 ng/ml, $P < 0,01$ respecto a H; $P < 0,05$ respecto a E).

Estos resultados indican que las concentraciones de corticosterona no están relacionadas con los resultados obtenidos (ver discusión).

2. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN EL GIRO DENTADO

2.1 Análisis de la capacidad proliferativa en la zona subgranular

El número de células en proliferación en las distintas condiciones experimentales se cuantificó por inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos anti-BrdU (en animales sacrificados a las 24h de la inyección) y anti-Ki67 (Kuhn y cols., 1996; Kee y cols., 2002). Como se había descrito anteriormente, en todos los grupos experimentales más del 90% de las células inmunopositivas (+) se encontraron asociadas formando unidades proliferativas con una distribución heterogénea a lo largo de la ZSG (Palmer y cols., 2000). Solamente se detectó una pequeña proporción de células aisladas en esta región, así como en las capas granular y molecular.

2.1.1 Proliferación celular: grupo P95

La deficiencia de HT durante 20 días (grupo P95H) indujo una reducción significativa de aproximadamente un 30% en el número total de células en proliferación en la ZSG. En las ratas hipotiroideas se cuantificó una reducción de un 31% en el número total de células BrdU+ ($P<0,05$) y de un 33% en el de células Ki67+ ($P<0,05$) respecto al grupo P95E (Figura 11a). El número de unidades proliferativas también estaba disminuido en las ratas P95H, alcanzando significación estadística en las unidades proliferativas identificadas con el anticuerpo anti-Ki67 (disminución del 17% para las células marcadas con BrdU, $P=0,181$ y del 30% para las Ki67+, $P<0,05$; Figura 11b).

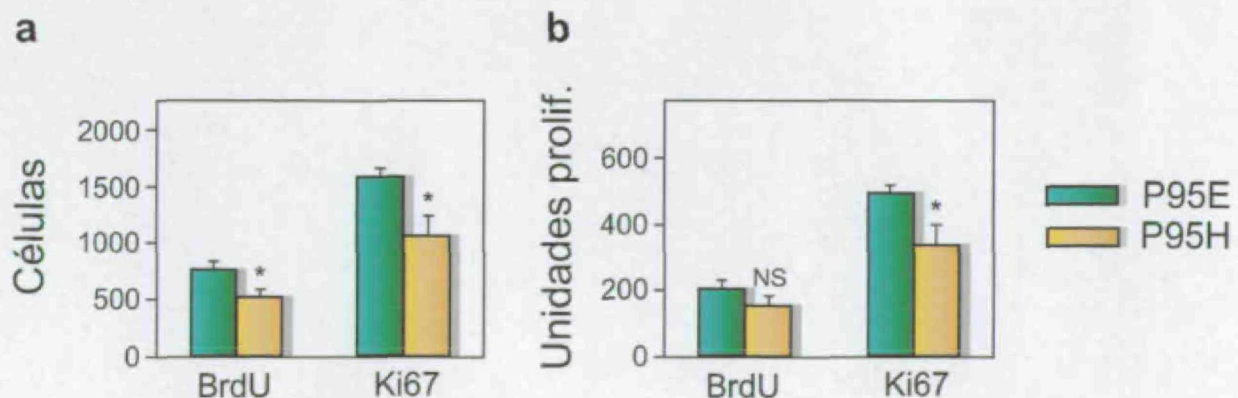


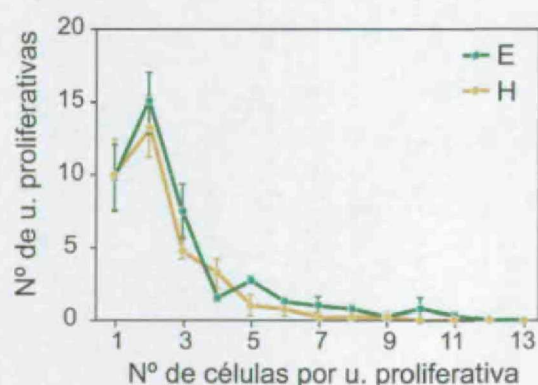
Figura 11. Proliferación celular en la ZSG de animales P95. a) Número total de células BrdU+ y Ki67+. b) Número de unidades proliferativas con ambos marcadores. Las gráficas representan la media \pm error estándar. Diferencias respecto al grupo eutiroideo: * $P<0,05$; NS, no significativo.

2.1.3 Análisis de las unidades proliferativas

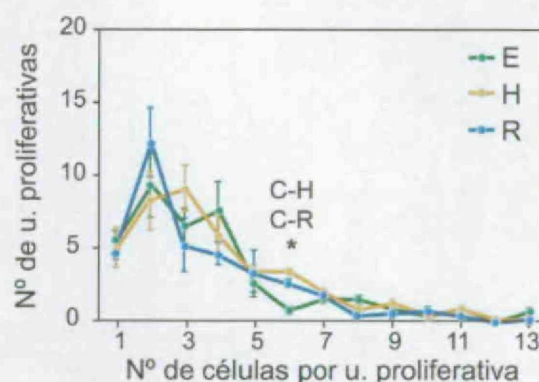
Para profundizar en el estudio de las alteraciones en la capacidad proliferativa de la ZSG debidas al hipotiroidismo se realizaron análisis complementarios de las unidades proliferativas en los grupos P95 y P120. Para ello las unidades proliferativas se clasificaron en distintas categorías en función del número de células en proliferación que contenían (unidades con 1 célula, con 2, con 3,...). La caracterización de las unidades proliferativas se realizó cuantificando las células BrdU y Ki67 inmunopositivas.

Por un lado se analizaron los patrones de distribución porcentuales de las distintas categorías de las unidades proliferativas con tablas de contingencia (Figura 13). El análisis estadístico no indicó diferencias significativas entre los grupos, es decir que el patrón de distribución de las distintas categorías era independiente del estado tiroideo, tanto en las unidades proliferativas BrdU+ como Ki67+.

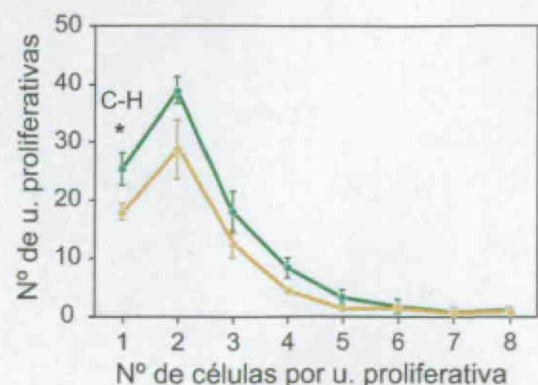
a) P95 BrdU



b) P120 BrdU



c) P95 Ki67



d) P120 Ki67

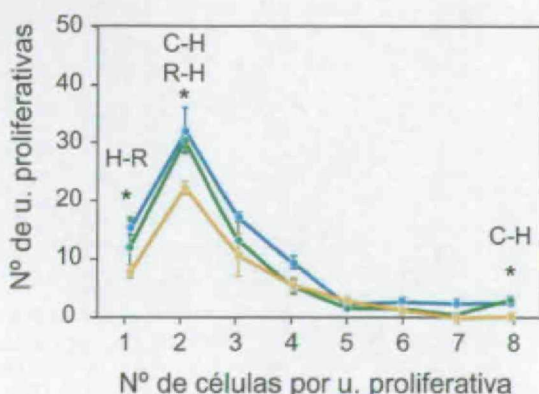


Figura 13. Distribución de las unidades proliferativas. En las gráficas se muestra el patrón de distribución del número de células BrdU+ y Ki67+, que es similar en todos los grupos estudiados ($P > 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos indicados, en una determinada categoría de unidades proliferativas.

También se compararon por separado cada una de las categorías entre los distintos grupos experimentales (2 células frente a 2 células, 3 células frente a 3, etc). En este caso se encontraron solamente algunas diferencias puntuales (Figura 13). Estos resultados indican que no se detectaron diferencias generalizables en las unidades proliferativas debidas al distinto estado tiroideo de los animales. Las diferencias en el número total de unidades proliferativas son debidas a la suma de los efectos parciales no significativos en las distintas categorías.

Todos estos resultados nos llevan a la conclusión de que un corto periodo de deficiencia hormonal en el adulto provoca una reducción considerable de la capacidad proliferativa en la ZSG que se puede revertir tras el tratamiento de reemplazo hormonal.

2.2 Análisis de las neuronas generadas *de novo*

Para determinar si la generación de neuroblastos y la maduración neuronal estaban afectadas por el hipotiroidismo adulto, se estudió por inmunohistoquímica el número, la distribución y la morfología de las células que expresan doblecortina (DCX). Esta proteína del citoesqueleto se localiza en el citoplasma, neuritas y conos de crecimiento de neuroblastos y neuronas inmaduras en las zonas neurogénicas adultas (Nacher y cols., 2001; Ribak y cols., 2004).

2.2.1 Generación de neuroblastos y maduración neuronal: grupo P95

En los animales eutiroides, las células DCX+ se alinean a lo largo de las hojas dorsal y ventral del GD, en la región limitante con la ZSG (Figura 14b). En general las células DCX+ presentan dendritas apicales desarrolladas, que en muchas ocasiones llegan a tocar el ventrículo. La mayoría de las dendritas DCX+ se orientan verticalmente hacia la capa molecular y sólo algunas longitudinalmente, siguiendo el borde interior del GD (Figura 14c).

El hipotiroidismo indujo importantes alteraciones en la población de células DCX+, tanto en su número como en su morfología. El análisis cuantitativo del número total de células DCX+ mostró una reducción del 32% en las ratas P95H ($P < 0,05$; Figura 14a), claramente apreciable en las vistas panorámicas del GD (Figura 14d). Además, en los animales hipotiroideos, las células DCX+ no se disponen alineadas en la región limitante de la ZSG, como se observaba en los animales eutiroides. La morfología del árbol dendrítico también mostraba claras alteraciones debidas al

hipotiroidismo (Figura 14e). La mayoría de las células DCX+ de los animales P95H presentaban un árbol dendrítico hipoplásico, con dendritas más finas y cortas y menos ramificadas, muchas de ellas con trayectorias aleatorias, no verticales a la capa molecular.

2.2.2 Generación de neuroblastos y maduración neuronal: grupo P120

El ANOVA de una vía mostró un efecto significativo del factor estado tiroideo en el número total de células DCX+ ($P<0,001$), que se correlaciona con los resultados obtenidos en los estudios de proliferación.

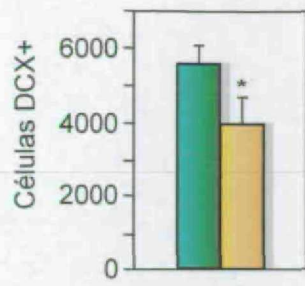
El hipotiroidismo adulto durante 45 días (ratas P120H) indujo una reducción del 25% en el número de células DCX+ en el GD respecto a las ratas eutiroides ($P<0,01$; Figura 14f). La distribución y la morfología de estas células también se encontraban alteradas en el grupo P120H (Figura 14i-j). Las células DCX+ presentaron un árbol dendrítico altamente hipoplásico, similar al descrito más arriba para las ratas P95H.

Al igual que se describió anteriormente en relación a las células en proliferación, las alteraciones presentes en las células DCX+ de animales hipotiroideos se recuperaron con el tratamiento hormonal. Se cuantificó un aumento del 50% en el número de células DCX+ ($P<0,01$ respecto a H), que se situó incluso un 13% por encima de los niveles de los animales eutiroides ($P<0,05$; Figura 14f). El tratamiento hormonal también mejoró las anomalías en la distribución y las alteraciones del árbol dendrítico de las células DCX+ en las ratas R. En estos animales la mayoría de las células presentaban un árbol dendrítico bien desarrollado con dendritas más largas y con abundantes ramificaciones, comparable al observado en condiciones de eutiroidismo (Figura 14k-l).

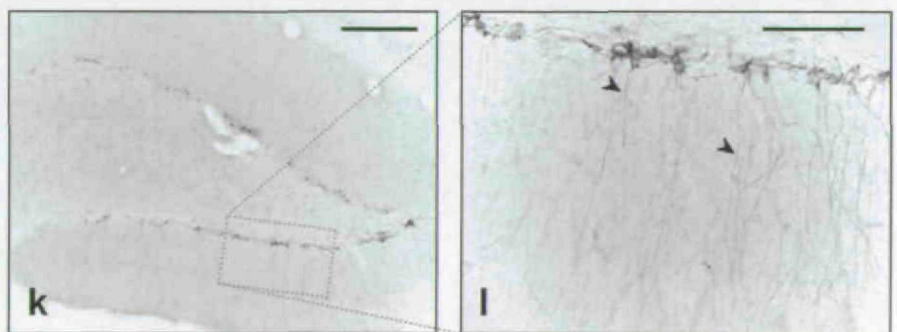
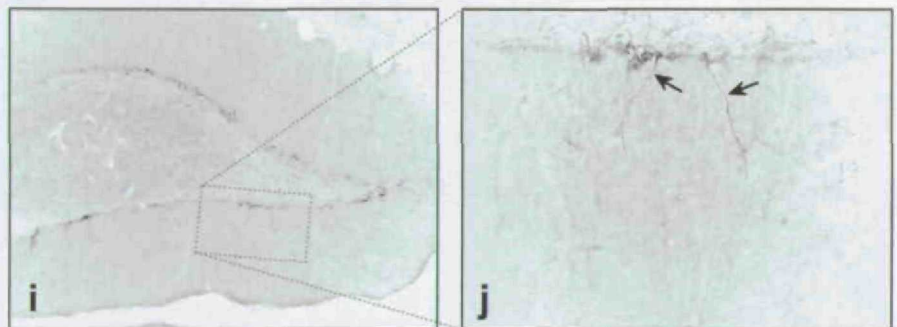
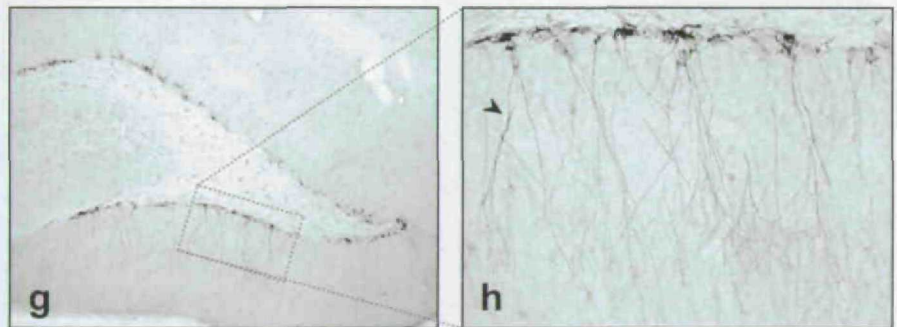
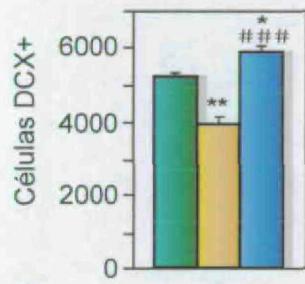
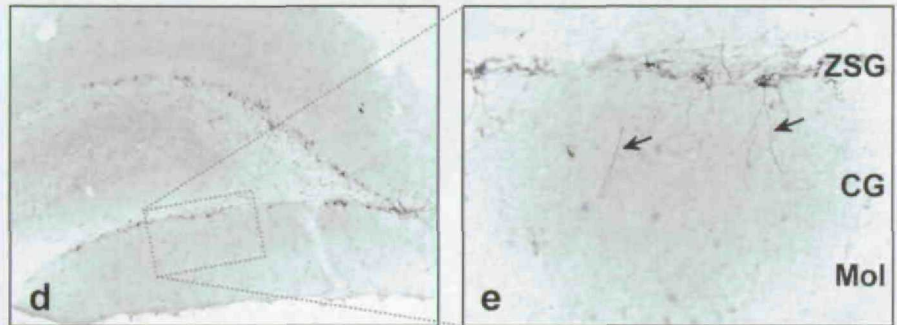
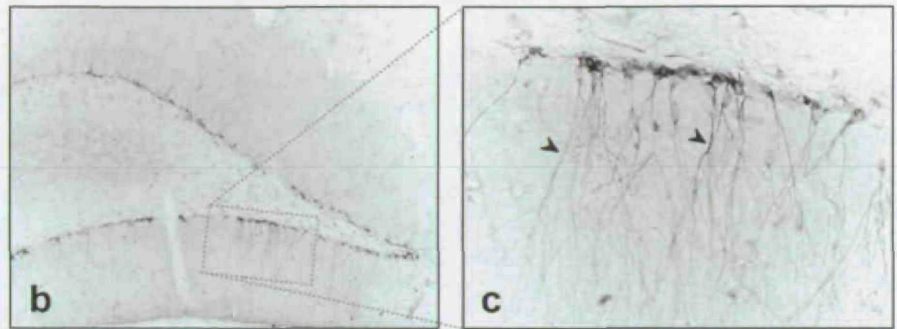
Estos resultados refuerzan los resultados anteriores y demuestran que la generación y maduración inicial de las neuronas generadas en el GD también se ven alteradas por la deficiencia de HT y que estas alteraciones pueden revertirse con el reemplazo hormonal.

Página siguiente:

Figura 14. Análisis de la maduración celular en el GD. a) y f) Número total de células DCX+ en animales P95 (a) y P120 (f). Las gráficas representan la media \pm error estándar. Diferencias respecto al grupo eutiroides: * $P<0,05$; ** $P<0,01$. Diferencias respecto al hipotiroideo: ### $P<0,001$. b-e) y g-l) Inmunohistoquímica para DCX (b-c P95E; d-e P95H; g-h P120E, i-j P120H, k-l P120R). Las flechas indican dendritas poco desarrolladas en los animales H y las cabezas de flechas dendritas bien desarrolladas en los animales E y R. ZSG, zona subgranular; CG, capa granular; Mol, capa molecular del GD. Escala, paneles de la izquierda: 250 μ m y paneles de la derecha: 50 μ m.



■ E
■ H
■ R



En conclusión, los resultados indican que las HT ejercen una influencia importante sobre la neurogénesis adulta en el GD ya que se necesitan concentraciones adecuadas de HT, tanto para mantener una tasa proliferativa apropiada en la ZSG como para inducir la generación y maduración de nuevas neuronas.

2.3 Análisis comparativo de la neurogénesis en las dos edades estudiadas: P95 y P120

Estudios previos habían establecido que la neurogénesis adulta disminuye con la edad del animal (Kuhn y cols., 1996). Por esta razón se realizó un análisis estadístico para comparar tanto la proliferación celular como la maduración neuronal entre los grupos P95 y P120.

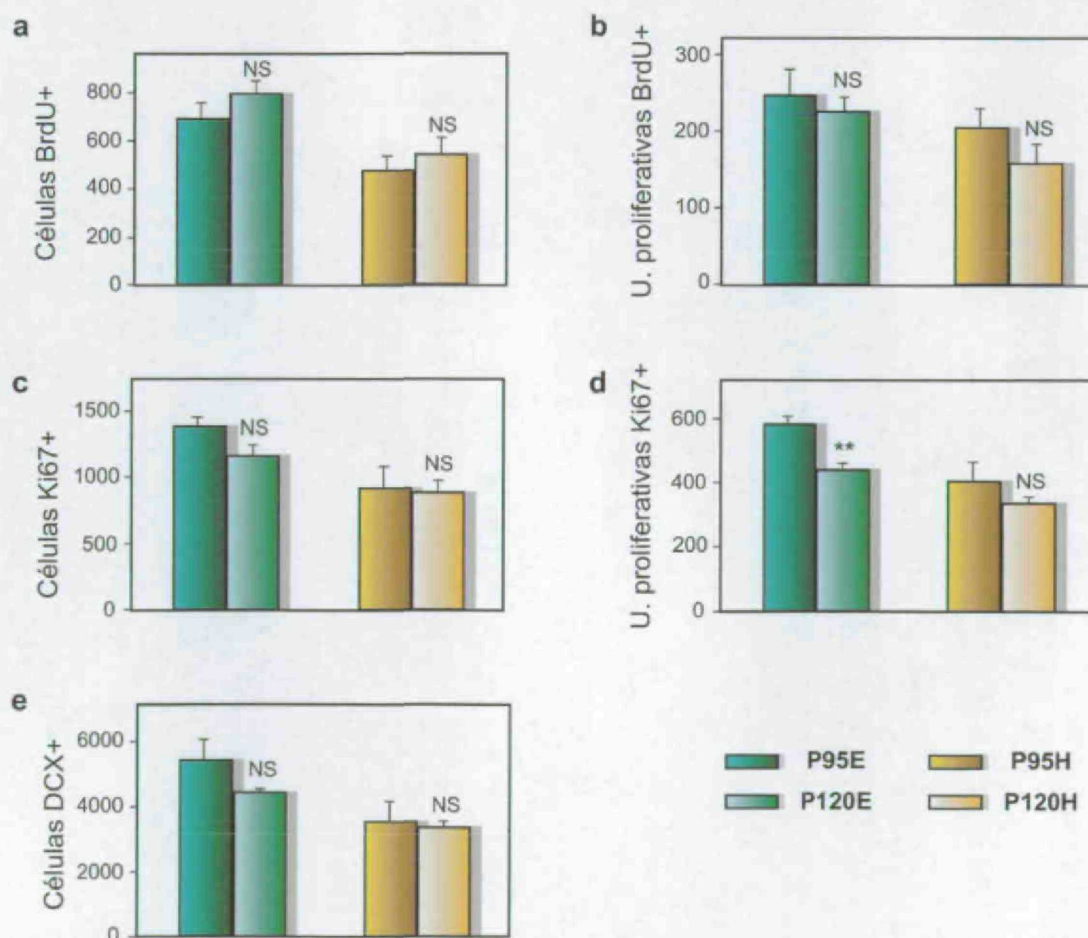


Figura 15. Comparación de la proliferación y maduración celular a distintas edades. a-b) Comparación del número total de células y unidades proliferativas BrdU+. c-d) Comparación del número total de células y unidades proliferativas Ki67+. d) Comparación del número total de células DCX+. Las gráficas representan la media \pm error estándar. Diferencias: * $P < 0,01$; NS no significativo.

No se encontraron diferencias en el número de células caracterizadas con los distintos anticuerpos utilizados (BrdU, Ki67 o DCX) entre ambas edades dentro del mismo grupo experimental (Figura 15). Este resultado se debe probablemente al corto intervalo de tiempo entre las edades estudiadas. Sólo se observaron diferencias significativas en el número de unidades proliferativas detectadas con el anticuerpo anti-Ki67 en los grupos eutiroideos.

2.4 Análisis de la muerte celular

Se determinó si la disminución en el número de células en proliferación y en el número de neuronas generadas *de novo* en los animales hipotiroideos se relaciona con un aumento de la muerte celular. Para ello se realizaron varios estudios con distintas técnicas que permiten detectar células apoptóticas.

El análisis cualitativo de núcleos picnóticos en la ZSG en animales P95 y P120, tanto con microscopía óptica (en secciones semifinas) como con microscopía electrónica, no mostró un aumento en los grupos de ratas hipotiroideas en comparación con sus correspondientes grupos eutiroideos.

También se analizó la apoptosis en secciones de vibratomo usando dos métodos diferentes: el método enzimático TUNEL y la inmunohistoquímica para la enzima proapoptótica caspasa-3 activada. No se encontró un aumento en el número de células TUNEL+ (P95E= 30 ± 7 ; P95H= 14 ± 2 ; $P= 0,05$), ni tampoco en el número de células inmunopositivas para caspasa-3 activada (P95E= 1068 ± 81 ; P95H= 1348 ± 139 ; $P= 0,08$) en los animales hipotiroideos.

En conjunto, estos datos indican que la reducción en el número de células en proliferación y neuronas generadas de novo en los animales hipotiroideos no se explica por un aumento de la muerte celular en esta región.

2.5 Supervivencia de las células generadas

Diversos estudios indican que sólo un 50% de las células que proliferan en la ZSG, sobreviven y se diferencian a células granulares maduras (Dayer y cols., 2003). Se ha establecido que el periodo

de tiempo necesario para la diferenciación de estas células es de aproximadamente 4 semanas (Cameron y cols., 1993).

Para estimar la supervivencia de las células generadas *de novo* en los distintos grupos experimentales, se cuantificó el número de células BrdU+ en el GD detectadas por inmunohistoquímica con microscopía óptica a las 4 y 3 semanas tras las inyecciones de la BrdU (protocolos 1 y 2, respectivamente; ver Materiales y Métodos).

2.5.1 Supervivencia de las células generadas en la ZSG: protocolo 1

Después de 4 semanas de las inyecciones de BrdU no se encontraron diferencias en el número de células BrdU+ en condiciones de eutiroidismo o hipotiroidismo ($P150E = 175,5 \pm 12,6$; $P150H = 176,4 \pm 20,2$; $P = 0,577$).

La tasa de supervivencia de las células BrdU+ se calculó como el porcentaje del número de células marcadas a P150 (30d después de la inyección de BrdU) respecto al número de células marcadas a P120 (1d después de la inyección de BrdU). A las 4 semanas de la última inyección de BrdU la tasa de supervivencia en los animales eutiroides era del 22% y en los animales hipotiroides alcanzaba el 32%.

2.5.2 Supervivencia de las células generadas en la ZSG: protocolo 2

Para corroborar los resultados obtenidos con el protocolo anterior y descartar la posibilidad de que se hubiera cometido un sesgo con ese protocolo, se utilizó otro protocolo adicional con el fin de marcar más células supervivientes. Este protocolo consistió en la administración de 6 inyecciones de BrdU espaciadas 12h (a lo largo de 3d) y el sacrificio de los animales a las 3 semanas de la última inyección.

Con este protocolo, tampoco se encontraron diferencias en el número de células BrdU+ supervivientes entre ninguna de las condiciones estudiadas ($P140E = 992,0 \pm 61,6$; $P140H = 992,0 \pm 161$; $P140R = 1030,5 \pm 63,4$; $P = 0,947$).

Los resultados obtenidos muestran que en los animales hipotiroides no hay diferencias en el número de células que se detectan a las 3 o 4 semanas del marcaje con BrdU respecto a los

animales eutiroides. Estos resultados probablemente se deban a la ralentización del ciclo celular en los animales hipotiroideos y no a un aumento en la supervivencia de las células generadas de novo (ver discusión).

2.6 Organización del giro dentado del hipocampo en los distintos estados tiroideos

Trabajos clásicos *in vivo* demuestran que el hipotiroidismo durante el desarrollo prenatal y postnatal temprano provoca una disminución del volumen del GD, así como alteraciones en la citoarquitectura de la capa granular (Rabie y cols., 1979; Rami y cols., 1986a; Rami y cols., 1986b; Madeira y cols., 1991).

2.6.1 Estudio de la anatomía y citoarquitectura del giro dentado

La anatomía y citoarquitectura del GD se analizó utilizando la tinción de Nissl en secciones adyacentes a las utilizadas para inmunohistoquímica y en cortes semifinos de los cerebros procesados para microscopía electrónica.

Se analizaron cualitativamente diferentes aspectos de la organización celular del GD, como su estratificación, y la morfología y distribución celular. No se observaron alteraciones apreciables debidas al hipotiroidismo ni a los 20 (grupo P95H) ni a los 45 días (grupo P120H) tras la tiroidectomía (Figura 16 a y c).

La cuantificación del volumen del GD por métodos estereológicos no mostró diferencias entre los animales con distinto estado tiroideo (Tabla 2). Este resultado indica que la deficiencia de HT durante 20 o 45 días no provoca una disminución del volumen de esta estructura en la rata adulta.

	P95E	P95H	P120E	P120H	P120R
Volumen del GD (mm ³)	0,74 ± 0,04	0,69 ± 0,04 ^{NS}	0,90 ± 0,03	0,76 ± 0,08 ^{NS}	0,80 ± 0,06 ^{NS}

Tabla 2. Medidas del volumen del giro dentado. Los resultados muestran la media ± error estándar. No hay diferencias significativas entre los grupos estudiados.

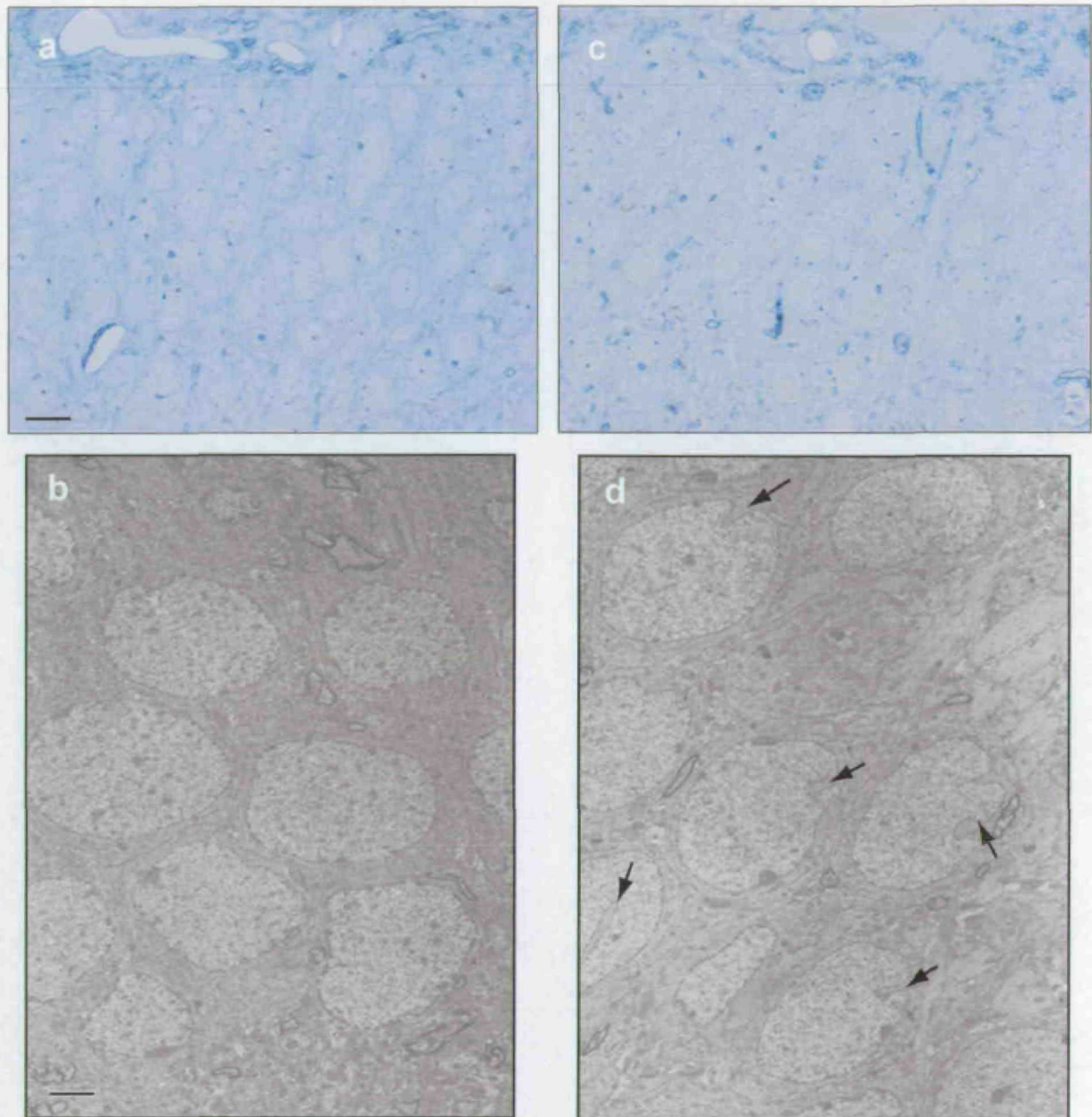


Figura 16. Análisis de la citoarquitectura y ultraestructura del giro dentado. A-B, animales P120E. C-D, animales P120H. A y C son microfotografías de la capa granular del GD en semifinos teñidos con la técnica de Nissl. Escala, 10 μ m. B y D son fotografías de microscopía electrónica donde se indica la elevada proporción de invaginaciones nucleares en los animales P120H (flechas). Escala, 2 μ m.

2.6.2 Estudio de la ultraestructura del giro dentado

El análisis con microscopía electrónica de las capas granular y subgranular del GD del hipocampo no reveló grandes diferencias ultraestructurales entre los distintos grupos experimentales. La única diferencia que se observó fue un aumento en la presencia de invaginaciones nucleares en las neuronas granulares en las ratas P120H (Figura 16d). El estudio de aproximadamente 400 muestras de perfiles nucleares en ratas P95 y P120 (E y H) reveló un aumento en el número de núcleos invaginados tras 45 días de hipotiroidismo (grupo P120H). En este grupo se encontraron invaginaciones nucleares en el 50% de las células de la capa granular, mientras que el porcentaje en los grupos P120E y P95 fue sólo del 10-15%.

Estos resultados muestran que la deficiencia de HT por un corto periodo de tiempo (20 días) en el adulto no provoca alteraciones en la anatomía del GD del hipocampo. Una deficiencia más prolongada de HT (45 días), aunque tampoco provoca cambios en la anatomía del GD, sí revela algunas alteraciones ultraestructurales.

3. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN EL COMPORTAMIENTO

3.1 Prueba de nado forzado

3.1.1 Hipotiroidismo y reemplazo hormonal

Trabajos anteriores de otros grupos (Malberg y Duman, 2003; Santarelli y cols., 2003; Jiang y cols., 2005) parecen demostrar que existe una relación entre la disminución de la neurogénesis adulta en el hipocampo y la depresión. Teniendo en cuenta que los desórdenes depresivos se asocian frecuentemente con el hipotiroidismo adulto (Joffe y Levitt, 1993) y apoyándonos en nuestros resultados anteriores en relación a la neurogénesis, decidimos evaluar el estado de ánimo de los animales usando la prueba de nado forzado. En este modelo de depresión, las ratas son forzadas a nadar en un tanque del que no pueden escapar. Después de un periodo de actividad vigorosa, el animal se queda inmóvil, flotando y haciendo sólo los movimientos imprescindibles

para mantener la cabeza fuera del agua. La inmovilidad indica un estado de desesperanza en el cual la rata ha aprendido que es imposible escapar y se resigna a las condiciones experimentales (Porsolt y cols., 1977). Primero se realiza un entrenamiento de nado forzado, que actúa como un estrés moderado. Este estrés influye en la respuesta a la prueba del día siguiente. La tendencia a un comportamiento de tipo depresivo en un grupo experimental determinado se evalúa por el aumento de la duración del tiempo de flotación durante la prueba respecto a un grupo control.

En nuestro experimento y durante la sesión de entrenamiento, todos los grupos presentaron un tiempo de flotación similar ($F_{2,21} = 2,061$; $P = 0,153$; Figura 17). Este resultado descarta cualquier posible diferencia inicial de reactividad entre los grupos, incluyendo una posible alteración motora en las ratas hipotiroideas o una mayor tendencia a la hipotermia en estos animales que pudiera alterar su movilidad. Sin embargo, el ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del factor estado tiroideo para el tiempo de flotación durante la prueba ($F_{2,21} = 25,881$; $P < 0,001$). Los análisis *a posteriori* mostraron que el hipotiroidismo aumentaba significativamente la duración del tiempo de flotación ($P120E = 117,6s$; $P120H = 188,7s$; $P < 0,001$; Figura 17). Este efecto se revierte con el tratamiento de reemplazo hormonal ($P120R = 138,5s$, $P < 0,001$ *versus* ratas H; $P = 0,112$ *versus* ratas E; Figura 17).

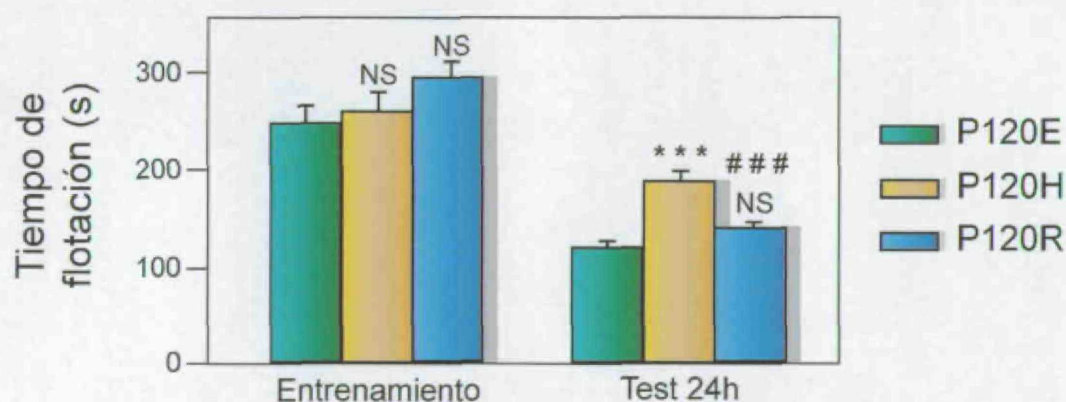


Figura 17. Prueba de nado forzado en animales E, H y R. Las gráficas representan la media \pm error estándar. Diferencias respecto al grupo eutiroideo: *** $P < 0,001$; NS, no significativo. Diferencias respecto al grupo hipotiroideo: ### $P < 0,001$.

Estos resultados indican que la deficiencia de HT provoca una mayor susceptibilidad al comportamiento de tipo depresivo, que se puede normalizar con el reemplazo hormonal.

Teniendo en cuenta que los estudios de proliferación y la prueba de nado forzado se realizaron utilizando los mismos animales (grupo P120), se pueden correlacionar los datos obtenidos en ambos análisis para evaluar la posible relación entre ellos. La comparación entre el tiempo de flotación durante la prueba de nado forzado y el número de células BrdU+ en ratas con diferente estado tiroideo indicó una relación inversa entre ambos parámetros en condiciones de hipotiroidismo (Figura 18).

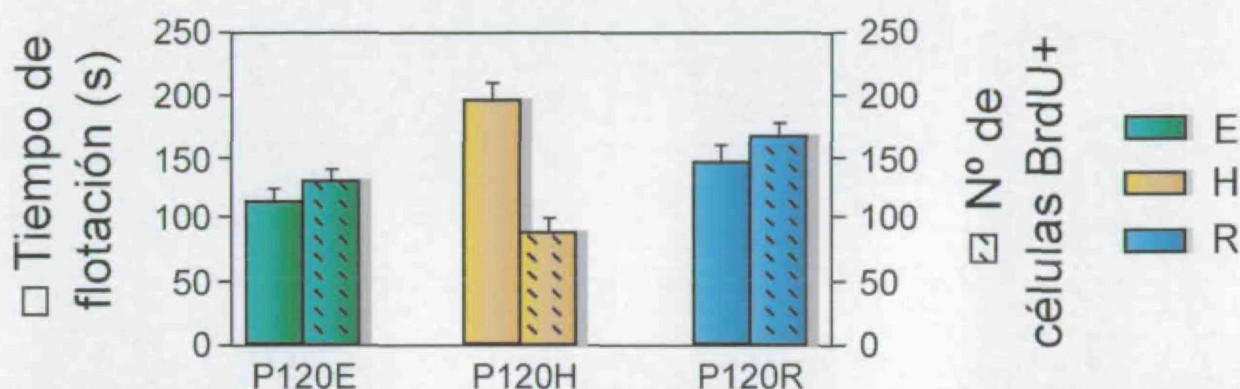


Figura 18. Correlación entre el comportamiento depresivo y la proliferación en la ZSG en los mismos animales. El aumento del tiempo de flotación se correlaciona con la disminución del número de células BrdU+ en los animales hipotiroideos. Las gráficas representan la media \pm error estándar.

Estos resultados indican que las HT influyen no sólo en la neurogénesis del GD sino también en el comportamiento de tipo depresivo y que ambos procesos parecen estar relacionados.

3.1.2. Tratamiento agudo con hormonas tiroideas

El reemplazo hormonal se puede considerar como un tratamiento crónico, pues se lleva a cabo durante 25 o 45 días en los que se consiguen normalizar los niveles hormonales en las ratas tratadas (Tabla 1). Para evaluar la posibilidad de que el tratamiento con HT pueda afectar al comportamiento de tipo depresivo a través de mecanismos directos no relacionados con la neurogénesis, se estudió el efecto de una administración aguda de HT en este comportamiento.

Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron pruebas de nado forzado adicionales utilizando ratas P120E, P120H y dos grupos diferentes de animales tratados de forma aguda con HT. El grupo P120W recibió el tratamiento de reemplazo hormonal en el agua de bebida desde 48h antes del test.

El grupo P120I recibió una única inyección de HT inmediatamente después del entrenamiento (24h antes del test) a una dosis 10 veces superior a la utilizada en el reemplazo hormonal.

En este experimento tampoco se observaron diferencias entre los grupos durante la fase de entrenamiento ($F_{2,21} = 0,774$, $P = 0,518$; Figura 19). Los resultados de este experimento mostraron que las ratas tratadas de manera aguda con HT (P120I y P120W) se comportaban de forma similar a los animales P120H (P120E = $123,0 \pm 8,5$; P120H = $166,8 \pm 10,8$; P120I = $172,5 \pm 16,8$; P120W = $165,0 \pm 6,8$; todos los grupos, $P < 0,05$ versus E; Figura 19), sin que el tratamiento hormonal consiguiera revertir las alteraciones del comportamiento.

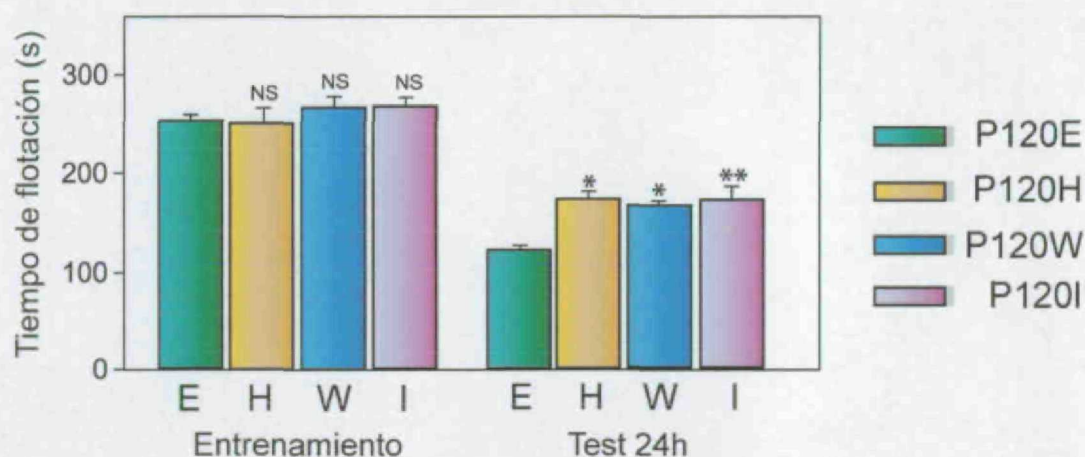


Figura 19. Prueba de nado forzado: animales con tratamiento agudo. Las gráficas representan la media \pm error estándar. Diferencias respecto al grupo eutiroides: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; NS, no significativo.

Estos resultados vienen a reforzar la hipótesis de la relación existente entre la neurogénesis en el GD y el comportamiento de tipo depresivo, y nuestros resultados obtenidos anteriormente en el presente trabajo sobre la modulación de ambos procesos por el estado tiroideo.

3.2 Reconocimiento de un objeto nuevo

Para evaluar si la disminución de los niveles de HT compromete en general la actividad hipocampal, se sometió a los animales a la tarea de reconocimiento de un objeto nuevo (Ennaceur y Delacour, 1988). En esta prueba se mide la memoria de reconocimiento visual, un modelo de memoria explícita que depende de la función del hipocampo (Myhrer, 1988).

Esta prueba se realizó en los grupos de ratas P120 (E, H, R). Los 3 grupos exploraron los dos objetos presentados durante un periodo de tiempo similar durante la sesión de entrenamiento ($F_{2,21} = 0,17$; $P = 0,85$). Este resultado descarta cualquier preferencia inicial por alguno de los objetos en cualquiera de los grupos estudiados. Tampoco se observó ninguna alteración locomotora o exploratoria en las ratas hipotiroideas. Un día después del entrenamiento, durante la prueba de retentiva, las ratas de todos los grupos mostraron una fuerte preferencia por explorar el objeto nuevo, como indica el índice de discriminación, significativamente diferente del nivel de casualidad, que es del 50% (P120E= 65,3%, $t_7 = 10,1$, $P < 0,001$; P120H= 67,3%, $t_6 = 7,02$, $P < 0,001$; P120R= 61,8%, $t_8 = 2,2$, $P < 0,05$; Figura 20). Además no se hallaron diferencias entre los grupos ($F_{2,21} = 0,52$; $P = 0,60$; Figura 20). Estos resultados indican que todos los animales estudiados recuerdan el objeto familiar con la misma intensidad independientemente de su estado tiroideo.

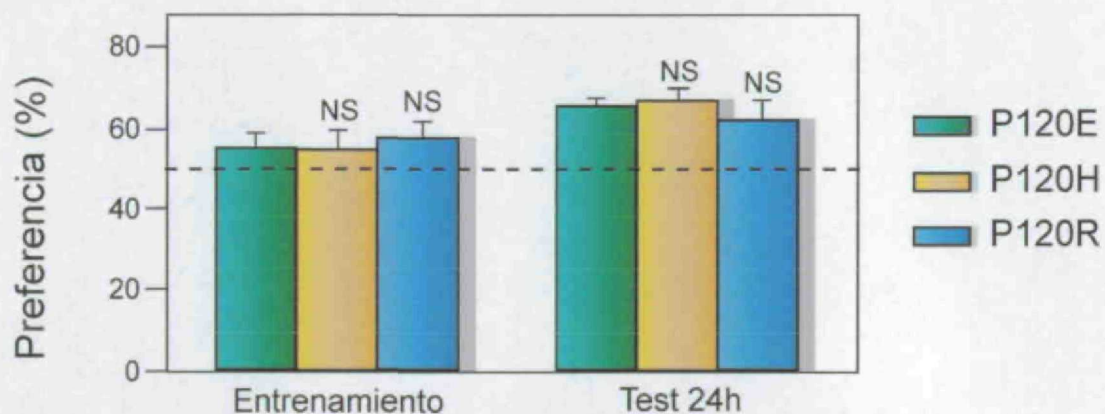


Figura 20. Prueba de reconocimiento de un objeto nuevo. Las gráficas representan la media \pm error estándar. No hay diferencias entre los grupos. NS, no significativo. La línea discontinua representa el nivel de casualidad (50%).

Podemos concluir que el hipotiroidismo adulto, al menos durante este periodo de tiempo, no altera la memoria de reconocimiento visual dependiente de hipocampo evaluada mediante esta prueba.

Estos resultados indican también que la disminución de la neurogénesis producida por la deficiencia de HT no es suficiente para producir alteraciones en el desarrollo de esta tarea relacionada con la actividad hipocampal.

3.3 Pruebas de condicionamiento por miedo

Para evaluar si el hipotiroidismo afecta a las capacidades de aprendizaje y memoria emocional de los animales, se realizaron las pruebas de condicionamiento al contexto y al sonido. En estas pruebas las ratas aprenden a tener miedo ante un estímulo inocuo (un contexto o un sonido) al asociarlo con un estímulo aversivo (una descarga eléctrica). Cuando se expone de nuevo al animal al contexto o al sonido, éste muestra una respuesta de miedo condicionado que se presenta como inmovilidad. El condicionamiento al sonido depende de la integridad de la amígdala, mientras que el condicionamiento al contexto es sensible a lesiones tanto en la amígdala como en el hipocampo (Phillips y LeDoux, 1992). La realización de ambas pruebas permite evaluar la integridad funcional de una u otra región.

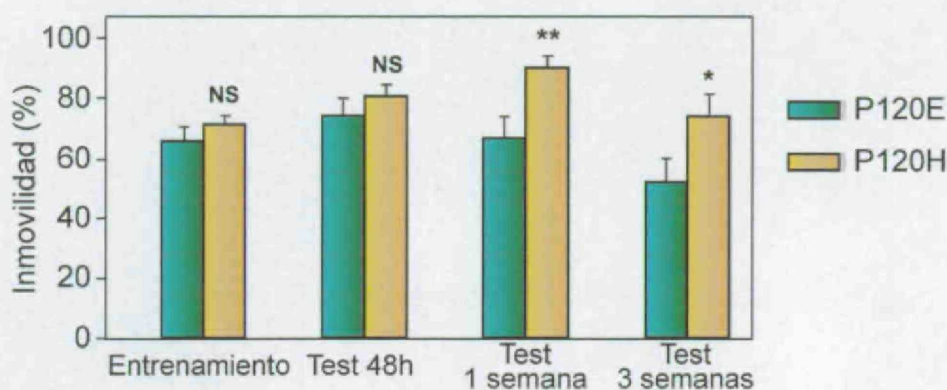
Se sometieron a esta prueba ratas P120 eutiroides e hipotiroideas. En el entrenamiento, ambos grupos de ratas presentaron unos niveles de inmovilidad similares durante el intervalo post-descarga ($P120E=65,7\pm5,2\%$; $P120H=71,2\pm3,0\%$; $t_{11}=1,343$; n.s.; Figura 21), lo que indica una sensibilidad similar al choque eléctrico. Tampoco se observaron diferencias iniciales durante el periodo pre-descarga.

Cuando se volvió a exponer a las ratas al sonido de condicionamiento 48h después del entrenamiento, tampoco se encontraron diferencias entre los grupos ($P120E=72,2\pm6,5\%$; $P120H=80,0\pm3,1\%$; $t_{11}=0,077$; n.s.; Figura 21). Como estaba descrito, los animales eutiroides mostraron una disminución en sus niveles de condicionamiento al ser reexpuestas al sonido 1 semana y 3 semanas después del entrenamiento (Figura 21). Sin embargo, las ratas hipotiroideas mostraron un tiempo de inmovilidad mayor en los ensayos de 1 semana ($P120E=73,7\pm4,5\%$; $P120H=91,8\pm2,8\%$; $t_{11}=2,524$; $P<0,01$; Figura 21) y 3 semanas después del entrenamiento ($P120E=57,5\pm6,4\%$; $P120H=74,7\pm6,5\%$; $t_{11}=1,818$; $P<0,05$; Figura 21) comparadas con las ratas eutiroides. En ningún caso se observaron diferencias significativas durante los periodos pre-sonido.

En la prueba de condicionamiento al contexto no se observaron diferencias entre las ratas E y H al re-exponer a los animales 24h ($P120E=47,4\pm6,7\%$; $P120H=55,6\pm6,0\%$; $t_{11}=0,318$; n.s) o 1 semana ($P120E=24,2\pm2,5\%$; $P120H=28,9\pm4,6\%$; $t_{11}=0,106$; n.s; Figura 21) después del entrenamiento. Sin embargo, sí que se encontraron diferencias significativas entre los grupos 3

semanas después del condicionamiento ($P120E = 15,6 \pm 1,2\%$; $P120H = 24,2 \pm 3,9\%$; $t_{11} = 2,405$; $P < 0,05$; Figura 21).

a Sonido



b Contexto

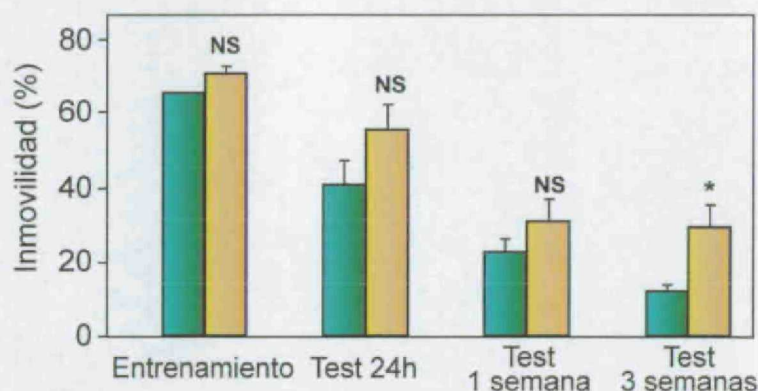


Figura 21. Pruebas de condicionamiento por miedo. a) Condicionamiento al sonido. b) Condicionamiento al contexto. Las gráficas representan la media \pm error estándar. Diferencias respecto al grupo eutiroides: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; NS, no significativo.

Los resultados indican que las memorias emocionales están potenciadas en los animales hipotiroideos. Las diferencias observadas en los estudios de condicionamiento entre los distintos estados tiroideos no parecen estar relacionadas con la función hipocampal.

DISCUSIÓN

Desde hace años se sabe que se necesitan concentraciones adecuadas de HT sistémicas, no sólo para el correcto desarrollo del SN, sino también para el mantenimiento del SN adulto. Sin embargo, mientras que el estudio de las acciones biológicas de las HT sobre el SN en desarrollo ha generado un gran interés científico, muy pocos estudios han analizado la influencia de las HT sobre la función cerebral en el individuo adulto. Esto probablemente se deba, entre otros motivos, a conceptos establecidos basados en estudios de los años 60 que indicaban que el cerebro adulto no respondía metabólicamente al estado tiroideo.

Precisamente en el momento de iniciarse esta tesis doctoral empezaba a surgir un nuevo campo de estudio dentro de la neurobiología, debido al reconocimiento de la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto. Los estudios iniciales sobre la neurogénesis adulta indicaban que muchos de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo pueden ocurrir también en el adulto, y además modularse por señales similares. La importancia de las HT en distintos procesos de neurogénesis y gliogénesis durante el desarrollo sugería su posible implicación en la neurogénesis adulta.

La aportación más relevante de este trabajo ha sido demostrar que se necesitan niveles adecuados de HT para la correcta generación de nuevas neuronas granulares en el GD adulto. Los estudios *in vivo* presentados muestran claramente que el hipotiroidismo en el individuo adulto, incluso durante un corto periodo de tiempo, altera la capacidad proliferativa de la ZSG, la generación de neuroblastos y su maduración posterior. Además, la deficiencia hormonal provoca una tendencia al comportamiento de tipo depresivo. El tratamiento de reemplazo hormonal revierte, en los mismos animales, los cambios en la proliferación y maduración celular en la ZSG en paralelo a la normalización del comportamiento de tipo depresivo. Estos resultados sugieren la existencia de una relación causal entre el hipotiroidismo, la reducción de la neurogénesis y la tendencia al comportamiento de tipo depresivo. Además, el hecho de que el tratamiento agudo con HT no sea capaz de revertir las alteraciones conductuales refuerza la posibilidad de esta relación.

1. Hormonas tiroideas y neurogénesis

1.1 Proliferación en el giro dentado

Para cuantificar la capacidad proliferativa de la ZSG en animales con distinto estado tiroideo se usaron dos marcadores diferentes, obteniendo una buena correlación entre ellos.

En las células en proliferación en la ZSG, la fase S del ciclo celular dura aproximadamente 8h y el ciclo completo 25h (Cameron y McKay, 2001). El compuesto BrdU se incorpora sólo durante la fase S del ciclo celular y tiene una vida media de 2h en la circulación. El protocolo utilizado (4 inyecciones espaciadas 2h y el sacrificio de los animales a las 24h de la primera inyección) marca fundamentalmente células en proliferación. De hecho, el marcaje obtenido con los anticuerpos anti-BrdU concuerda con el que se obtiene tras la detección del antígeno de proliferación Ki67, que se expresa durante todas las fases del ciclo celular (Kee y cols., 2002). El porcentaje de células inmunopositivas para ambos marcadores era muy similar en cada uno de los grupos experimentales. Además, en todos los grupos, más del 90% de las células BrdU y Ki67 inmunopositivas se encontraban formando parte de unidades proliferativas. La correlación de los resultados obtenidos caracterizando ambos marcadores de proliferación indica que con el protocolo de BrdU utilizado apenas se detectan células postmitóticas BrdU+. Además, esta correlación descarta la posibilidad de que la reducción observada en el número de células BrdU+ en condiciones de hipotiroidismo se deba a restricciones del paso de la BrdU a través de la barrera hematoencefálica.

Nuestros resultados indican que la capacidad proliferativa de la ZSG es muy sensible a los niveles circulantes de HT. Hemos cuantificado una reducción del 30% en el número de células en proliferación tan sólo 20 días tras la tiroidectomía. Hay que tener en cuenta que, aunque se extirpe el tiroides, para conseguir un hipotiroidismo cerebral tienen que disminuir los niveles intracerebrales de HT. La existencia de mecanismos que mantienen la homeostasis de HT cerebrales hace que se retrase esta disminución (Silva y Matthews, 1984; Obregon y cols., 1991). A los 15 días de la tiroidectomía las concentraciones intracerebrales de HT disminuyen aproximadamente un 50% y a los 2 meses se alcanzan los niveles mínimos hormonales (alrededor de un 15% de los niveles eutiroides; Obregón y cols., 1981).

En el último año del desarrollo de esta tesis doctoral se han publicado dos estudios en los que también se analiza la implicación de las HT en la neurogénesis en la ZSG de ratas adultas (Ambrogini y cols., 2005; Desouza y cols., 2005). En ninguno de estos estudios se detectan efectos de las HT sobre la proliferación en la ZSG adulta *in vivo*, aunque sí observan una disminución de la neurogénesis en condiciones de hipotiroidismo (ver siguiente apartado). Las discrepancias con el trabajo desarrollado en esta tesis pueden deberse a la utilización de drogas antitiroideas en estos estudios para inducir el hipotiroidismo adulto. El uso de drogas antitiroideas provoca una disminución mucho más lenta de los niveles de HT circulantes y cerebrales que la tiroidectomía quirúrgica, ya que la glándula tiroides es el único reservorio de HT corporales. Las discrepancias señaladas podrían deberse además a las diferencias en los protocolos de BrdU utilizados. En los dos estudios anteriores utilizan un protocolo de administración de BrdU muy semejante (1 inyección cada 12h durante 2 o 3 días) que por su duración marcaría más células postmitóticas que nuestro protocolo. Por otra parte, en estos trabajos no se ha utilizado un método alternativo de detección de un antígeno de proliferación endógeno que verifique la cuantificación de las células en proliferación. Sin embargo, otros estudios si han cuantificado en estadios juveniles una disminución de la proliferación en la ZSG provocada por la deficiencia de HT durante el desarrollo, en un modelo experimental murino de hipotiroidismo congénito (Uchida y cols., 2005). Además, el tratamiento de estos animales con T3 consigue normalizar la capacidad proliferativa del GD.

También recientemente varios grupos han investigado las acciones de las HT sobre la neurogénesis en la otra región neurogénica del cerebro adulto, la ZSV, con resultados muy dispares. Se ha descrito tanto un descenso en la proliferación celular en ratones con hipotiroidismo adulto (Lemkine y cols., 2005), como un aumento en ratas hipotiroideas adultas (Fernández y cols., 2004). En un trabajo anterior de Giardino y cols. (Giardino y cols., 2000) no detectaban diferencias en la proliferación en la ZSV en ratas adultas tratadas con una droga antitiroidea, aunque el tratamiento con T3 aumentaba considerablemente la proliferación en esta región. Estas divergencias pueden deberse a diferencias en el modelo experimental estudiado y también a la complejidad celular de la ZSV. Se ha descrito que en la ZSV se generan neuronas pero también una proporción considerable de células gliales y en especial oligodendrocitos. Hay que tener en cuenta que las HT en combinación con factores de crecimiento, están implicadas en la proliferación de células precursoras de oligodendrocitos y en la diferenciación y maduración posterior de los mismos (Baas y cols., 1997). Por otra parte, la ZSV es una región con una elevada densidad celular y una heterogeneidad regional en cuanto a su capacidad proliferativa. Por ello es muy importante la utilización de métodos estereológicos adecuados para cuantificar de una manera fiable las células en proliferación en esta región.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento de las ratas hipotiroideas con HT aumenta el número de células en proliferación incluso por encima de los valores de los animales eutiroides. Este efecto parece sugerir un mecanismo rápido de recuperación de la neurogénesis después de un daño. Un mecanismo similar se ha descrito durante el periodo de abstinencia de alcohol. Se ha observado una reducción de la proliferación en la ZSG como consecuencia del consumo crónico de alcohol y un aumento temporal de hasta 4 veces en la proliferación en el GD tras 7 días de abstinencia (Nixon y Crews, 2004).

El número de unidades proliferativas también disminuye con el hipotiroidismo y aumenta con el tratamiento hormonal. Que sepamos, esta es la primera vez que se observa una variación en el número de unidades proliferativas en la ZSG como consecuencia de un mecanismo modulador de la neurogénesis. Este resultado es importante ya que las células que componen una unidad proliferativa parecen derivar de una única célula madre. Por tanto, la disminución del número de unidades proliferativas podría indicar la salida del ciclo celular de las células madre, la no activación de las mismas desde su estado de quiescencia, o la ralentización de su ciclo proliferativo. El aumento del número de unidades proliferativas tras el reemplazo hormonal, incluso por encima de los niveles eutiroides, indicaría que las HT son capaces de incrementar la capacidad proliferativa de la ZSG. Para profundizar en esta hipótesis sería muy interesante determinar si en condiciones de eutiroidismo el tratamiento hormonal también es capaz de aumentar esta capacidad proliferativa, resultando en un incremento de la neurogénesis en esta región.

Entre los posibles factores que pueden influir en la proliferación en la ZSG se encuentran los glucocorticoides (Cameron y Gould, 1994; Karishma y Herbert, 2002). Se ha descrito que hay una correlación negativa entre los niveles de glucocorticoides y la proliferación de precursores de células granulares (Cameron y Gould, 1994; Montaron y cols., 1999). Además, el aumento en los niveles plasmáticos de corticosterona inducido por situaciones de estrés (Tanapat y cols., 2001) o por la edad (Montaron y cols., 2006) disminuye considerablemente la proliferación en la ZSG. Por este motivo, se analizó la posibilidad de que variaciones de los niveles plasmáticos de corticosterona pudieran estar relacionadas con los resultados obtenidos. Estas variaciones podrían deberse al propio estado tiroideo de cada grupo experimental o a una diferente respuesta al estrés generado en nuestros protocolos experimentales relacionada con el estado tiroideo.

La concentración de corticosterona en los animales hipotiroideos era significativamente menor que en los eutiroides, lo que confirma estudios anteriores (Kamilaris y cols., 1991). Por lo que los efectos de las HT sobre la proliferación en el GD no parecen estar mediados por cambios en los

niveles de corticosterona plasmática, ni por una mayor respuesta al estrés en condiciones de hipotiroidismo.

1.2 Generación de nuevas neuronas en el giro dentado

En la ZSG, la mayoría de las células en proliferación se diferencian a neuronas (Steiner y cols., 2004). Por tanto, se esperaría que la reducción del número de células en proliferación en los animales hipotiroideos diera lugar a un menor número de neuroblastos. Esta hipótesis se confirmó analizando las células que expresan DCX, una proteína asociada a los microtúbulos que se expresa en neuroblastos y neuronas inmaduras. Se ha demostrado que la expresión de esta proteína refleja los niveles de neurogénesis en el GD adulto (Brown y cols., 2003b; Rao y Shetty, 2004; Couillard-Despres y cols., 2005). Todos los grupos de animales hipotiroideos presentan una disminución del número de células DCX+ en la ZSG. En dos estudios recientes, como se explica más arriba, también se ha observado que la neurogénesis adulta en el GD se modula por el estado tiroideo (Ambrogini y cols., 2005; Desouza y cols., 2005). En concreto, en uno de estos estudios observan una disminución de los neuroblastos inmaduros generados *de novo* detectados por la expresión de dos proteínas características de esta población celular (TUC-4 y PSA-NCAM; Ambrogini y cols., 2005). El efecto de la deficiencia de HT sobre la población de células DCX+ parece reflejar el defecto observado en el número de células en proliferación, ya que el porcentaje de reducción es similar en ambos casos en todos los grupos hipotiroideos estudiados.

El hipotiroidismo adulto no sólo disminuye el número de células DCX+, sino que además induce graves alteraciones en la morfología del árbol dendrítico de las células remanentes. Las dendritas de las células DCX+ de animales eutiroides contactan con la capa molecular del GD e incluso la atraviesan llegando hasta regiones muy cercanas al ventrículo. El significado funcional de estas largas dendritas no se conoce, pero pudieran ser importantes para la diferenciación terminal y la integración de las nuevas neuronas en circuitos operativos, de manera similar a lo que ocurre durante el desarrollo (Ribak y cols., 2004). Estas largas dendritas también podrían ser importantes para modular la proliferación de los neuroblastos DCX+. En este sentido se ha observado en estudios *in vitro* que los astrocitos estimulados con T3 activan la proliferación de precursores de células granulares del cerebelo. Esta activación de la proliferación celular está mediada tanto por la secreción de factores de crecimiento por los astrocitos, como por el establecimiento de contactos celulares astrocito-precursor neuronal (Martinez y Gomes, 2005). Hay que tener en cuenta además que la capa molecular del GD contiene una gran proporción de astrocitos que expresan D2 (Guadaño-Ferraz y cols., 1999), que es la enzima responsable de la generación local de la hormona

activa T3 en el SN. La hipoplasia del árbol dendrítico en condiciones de hipotiroidismo impediría la correcta señalización de estas dendritas que no alcanzarían la longitud de las normales y por tanto no contactarían con las células correspondientes ni recibirían las señales adecuadas.

El efecto que observamos del hipotiroidismo adulto en la extensión de neuritas concuerda con resultados previos de otros grupos sobre el papel de las HT en el ensamblaje y la estabilidad del citoesqueleto durante el desarrollo (Nunez y cols., 1991). El hipotiroidismo durante el desarrollo induce anomalías en el crecimiento de las neuritas a la vez que disminuye el número y la densidad de los microtúbulos (Nunez y cols., 1989). Se ha descrito que estos efectos podrían deberse a la modulación por HT de la expresión de varios componentes del citoesqueleto, en particular las tubulinas y ciertas proteínas asociadas a los microtúbulos (Stein y cols., 1990). Otros trabajos indican que el hipotiroidismo adulto reduce la extensión de procesos y el número de espinas en neuronas neocorticales, lo que se revierte tras 25 días de tratamiento con T4 (Ruiz-Marcos y cols., 1980).

Por otra parte, la expresión de DCX en las neuronas inmaduras puede estar relacionada con la reorganización de los microtúbulos y el crecimiento de procesos celulares (Deuel y cols., 2006), aunque hasta el momento no se ha descrito que la DCX sea un gen diana de HT. Con nuestros resultados podemos afirmar que hay una disminución del número de células DCX+, pero no podemos concluir si hay una disminución o no de la transcripción del gen que codifica esta proteína.

El tratamiento de animales hipotiroideos con HT aumenta el número de células DCX+ por encima de los niveles eutiroides y recupera de forma notable la morfología dendrítica de las células marcadas. El hecho de que el reemplazo hormonal sea capaz de recuperar no sólo la proliferación celular, sino también el número de neuroblastos comprometidos, indica que las HT deben ser un factor importante en la modulación de la neurogénesis adulta en la ZSG.

La acción de las HT sobre la neurogénesis en la ZSG podría deberse a un efecto directo sobre las células madre y los precursores neuronales, ya que en el GD adulto se expresan las isoformas principales de los TRs (Guadaño-Ferraz y cols., 2003). En concreto, se ha observado la expresión de TR α , TR β 1 y TR β 2 en células en proliferación en la ZSG (Desouza y cols., 2005). Las HT también podrían ejercer efectos indirectos sobre los precursores neuronales a través de otras poblaciones celulares. Se ha descrito que las HT estimulan la liberación de factores de crecimiento por astrocitos (Trentin y cols., 2003; Martínez y Gomes, 2005), que podrían actuar sobre las células madre o los progenitores neuronales.

1.3 Supervivencia de las nuevas células generadas

El análisis de la supervivencia celular reveló que no había diferencias en el número de células BrdU+ marcadas a largo plazo entre los animales eutiroideos e hipotiroideos. Para llevar a cabo este estudio se realizaron dos protocolos de inyecciones diferentes. En el protocolo 1 la pauta de inyección de BrdU es idéntica a la de los estudios de proliferación, lo que permite establecer la tasa de supervivencia de las células entre ambas edades, la cual estaba incrementada en los animales hipotiroideos. Con este protocolo se obtuvo un número de células marcadas pequeño, lo que podía conllevar un cierto sesgo por marcarse un número insuficiente de células. Para descartar este sesgo, se realizó el protocolo 2, con el que se marcan más células por administrar BrdU durante más días. Además, en este protocolo se reduce la dilución del marcaje con BrdU al acortar el tiempo de análisis de la supervivencia (de 4 a 3 semanas). En ambos casos se obtuvieron los mismos resultados, descartando el posible sesgo por evaluar un pequeño porcentaje de la población de células que sobreviven. En ambos protocolos se analizó el número de células marcadas cuando ya se ha producido la mayoría de la muerte en esta población celular (Dayer y cols., 2003).

El número de células BrdU+ que permanecen marcadas después de un tiempo largo desde la administración de la BrdU viene determinado por dos factores: la tasa de muerte celular y la dilución del marcaje por las sucesivas divisiones de las células que captaron la BrdU.

Se ha cuantificado que alrededor de un 50% de las neuronas generadas mueren durante el primer mes (Dayer y cols., 2003). En nuestros estudios no se observaron diferencias en el número de células apoptóticas entre los grupos estudiados valoradas con distintas aproximaciones experimentales (método TUNEL, detección de caspasa-3 activada y estudios morfológicos de células picnóticas). Por tanto, puede descartarse que el número de células que sobreviven en condiciones de hipotiroidismo esté alterado por este factor. Únicamente con el método TUNEL se apreció una tendencia a la reducción de la muerte celular en los animales hipotiroideos. Sería lógico que, al generarse menos células, también se muriera un número menor. Sin embargo, las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas y no se corroboran con los otros métodos utilizados. Además, el número de células detectadas con este método es muy pequeño y se ha sugerido que puede no ser un método muy fiable para obtener datos cuantitativos. Por otro lado, al no haber diferencias en la tasa de apoptosis entre los grupos estudiados, la disminución observada en el número de células en proliferación y en el número de neuronas generadas no debe producirse por un aumento de la muerte celular en estas poblaciones. En otros estudios (Ambrogini y cols., 2005; Desouza y cols., 2005) se ha observado un aumento de la muerte celular en la ZSG en animales hipotiroideos cuantificado por el método de TUNEL. En estos estudios se trata a los animales con

drogas antitiroideas que podrían tener un efecto específico sobre las células en esta región y diferente al de la tiroidectomía. En otro estudio no se detectaron diferencias en el índice de células picnóticas en el GD en desarrollo en animales hipotiroideos (Rami y cols., 1986b). Por su parte, Lemkine y cols. (Lemkine y cols., 2005) observaron una disminución de la muerte celular detectando caspasa-3 activada en la ZSV de ratones hipotiroideos adultos.

Al no detectar diferencias en la muerte celular, podemos concluir que la mayor tasa de supervivencia de las células BrdU+ a largo plazo en los animales hipotiroideos se debe probablemente a una menor dilución del marcaje. Esto sugiere que en estos animales se produce una reducción de la tasa de división celular, probablemente por un alargamiento del ciclo celular de los progenitores neuronales. Esta posibilidad se correlaciona con la reducción de la proliferación observada. De la misma manera, Lemkine y cols. (Lemkine y cols., 2005) estudiando la ZSV observan una menor proporción de células que, una vez han proliferado, vuelven a entrar en ciclo en los animales hipotiroideos. Se ha descrito que las HT regulan la expresión de varias proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular, aunque estos estudios, la mayoría *in vitro*, presentan resultados controvertidos (Barrera-Hernandez y cols., 1999; Perez-Juste y Aranda, 1999; Pibiri y cols., 2001; Holsberger y cols., 2003; Nygard y cols., 2003).

1.4 Anatomía y ultraestructura del giro dentado

A pesar de las alteraciones que se observan en la neurogénesis en los animales hipotiroideos, en nuestros estudios no se observaron diferencias en la distribución celular ni en el volumen total del GD entre los grupos estudiados. Esto coincide con otros estudios que analizaron estos parámetros en ratas adultas tratadas con diferentes drogas antitiroideas durante 21 o 28 días (Desouza y cols., 2005). En otro estudio tampoco se observaron diferencias en el volumen del GD por deficiencia de HT en animales con hipotiroidismo postnatal prolongado (hasta 4 meses), a pesar de detectar una disminución en el número total de neuronas granulares (Madeira y cols., 1991). Sin embargo, otros estudios detectaron una pequeña reducción del volumen del GD tras 30 días de tratamiento con una droga antitiroidea (Ambrogini y cols., 2005). Estudios clásicos indican que el hipotiroidismo durante el desarrollo provoca una disminución del crecimiento longitudinal y del volumen del hipocampo (Rabie y cols., 1979).

El análisis de la ultraestructura de las células granulares mostró un aumento en la proporción de células con invaginaciones nucleares a los 45 días de la tiroidectomía y no antes. El significado de

este hallazgo no se conoce, y no se había descrito anteriormente como un cambio ultraestructural debido al hipotiroidismo, pero podría estar relacionado con una disminución de la actividad transcripcional. Cuando disminuye la actividad transcripcional hay un aumento de la compactación de la cromatina y esto induce una disminución del volumen nuclear. Como consecuencia de esta disminución la membrana nuclear redundante se invagina. Se piensa que esto ocurre porque la membrana nuclear es muy estable y de esta manera se consigue tener un reservorio de membrana en el caso de que cambie la actividad transcripcional. De hecho, este proceso de formación de invaginaciones nucleares puede ocurrir de manera reversible en neuronas diferenciadas en respuesta a diferentes estímulos que modifican la actividad transcripcional (Lafarga y cols., 1998). Por otra parte, la diferenciación neuronal y la extensión de dendritas implican un aumento en la actividad transcripcional, que también se acompaña de cambios en la morfología nuclear (Navascues y cols., 2004). Además, la presencia de invaginaciones nucleares se ha detectado en células indiferenciadas (Johnson y cols., 2003).

En esta tesis no hemos realizado un estudio morfométrico del tamaño nuclear de las células granulares, pero otros grupos si han detectado una disminución de su tamaño nuclear en ratas hipotiroideas adultas (Ambrogini y cols., 2005). Esto se podría correlacionar con el aumento de la proporción de células con invaginaciones nucleares en nuestro modelo de hipotiroidismo adulto.

2. Hormonas tiroideas y comportamiento

2.1 Comportamiento de tipo depresivo

La prueba de nado forzado es el test mejor caracterizado y más ampliamente utilizado para evaluar alteraciones en el comportamiento de tipo depresivo en roedores (Porsolt y cols., 1991; Redei y cols., 2001). Diversas evidencias experimentales indican que las alteraciones psiquiátricas, incluyendo la depresión, están relacionadas con la neurogénesis en el GD adulto (Malberg, 2004), y en especial con la capacidad proliferativa de la ZSG. El tratamiento crónico con fármacos antidepresivos aumenta la proliferación en el GD sin afectar a la diferenciación (Malberg y cols., 2000). Además, para la eficacia terapéutica de estos fármacos es necesaria la estimulación de la proliferación de los precursores en la ZSG (Santarelli y cols., 2003).

Nuestros resultados indican que el hipotiroidismo adulto, en paralelo a la reducción de la proliferación de la ZSG, induce un comportamiento de tipo depresivo. En un estudio previo también se observó que el hipotiroidismo severo aumentaba el tiempo de flotación en la prueba de nado forzado en comparación con ratas eutiroideas y que este efecto sólo se prevenía con dosis

elevadas de T4 (Kulikov y cols., 1997). El tratamiento con HT utilizado en esta tesis consiste en la administración crónica de una combinación fisiológica de T4 y T3 basada en estudios previos, en los que observaban que sólo esta combinación era capaz de normalizar los niveles de HT en diversas regiones cerebrales (Escobar-Morreale y cols., 1996). Probablemente por ello, el reemplazo hormonal que conseguimos con este protocolo no sólo recupera la tasa proliferativa de los progenitores de la ZSG sino que es capaz de revertir también las alteraciones del comportamiento, como ocurre en otras situaciones de activación de la proliferación en el GD (Malberg y Duman, 2003; Santarelli y cols., 2003; Jiang y cols., 2005). Estos resultados muestran que hay una alteración de la conducta emocional provocada por el hipotiroidismo, que podría correlacionarse con las alteraciones de la neurogénesis.

En este estudio hemos comprobado que el tratamiento agudo con HT no es capaz de normalizar el comportamiento de tipo depresivo en los animales hipotiroideos. Esto descarta que la mejoría del estado depresivo se deba a una acción rápida de las HT. El tiempo necesario para inducir cambios funcionales tras el tratamiento hormonal refuerza la posibilidad de una correlación entre el estado tiroideo, la neurogénesis y el comportamiento. De todas formas, no se puede descartar que la modulación de la actividad serotoninérgica y noradrenérgica por HT pudiera estar implicada en el desarrollo de la prueba de nado forzado en los distintos grupos experimentales. Hay que tener en cuenta también, que tanto la serotonina como la norepinefrina modulan la proliferación en la ZSG y por tanto la generación de nuevas neuronas en el GD adulto (Brezun y Daszuta, 1999; Banasr y cols., 2001; Kulkarni y cols., 2002).

Está bien establecido que el estrés puede influir en el comportamiento, y más específicamente en el comportamiento de tipo depresivo (Johnson y cols., 2006). Bajos niveles de glucocorticoides en suero se han relacionado con una reducción en el tiempo de flotación en la prueba de nado forzado y viceversa (Baez y Volosin, 1994). Las medidas de los niveles plasmáticos de corticosterona en los distintos estados tiroideos descartan la posibilidad de que el aumento en el tiempo de flotación en las ratas hipotiroideas en la prueba de nado forzado se deba a alteraciones de la función adrenal.

En humanos, las alteraciones de la función tiroidea se han relacionado con alteraciones psiquiátricas, especialmente con estados depresivos, que son reversibles con una terapia de reemplazo hormonal (Oomen y cols., 1996; Joffe, 2002). Por otra parte, estudios epidemiológicos han encontrado que las mejorías del estado de ánimo y determinadas funciones neuropsicológicas son los parámetros más sensibles para evaluar la eficacia del tratamiento de reemplazo con HT en

individuos hipotiroideos (Bunevicius y cols., 1999). De esto se deduce que pequeñas variaciones de los niveles de HT en el adulto afectan mucho más a la funcionalidad del cerebro que a otros parámetros bioquímicos. Además, en pacientes refractarios al tratamiento con fármacos antidepresivos el tratamiento adyuvante con HT durante varias semanas resulta beneficioso (Aronson y cols., 1996).

2.2 Aprendizaje y memoria

No se han observado alteraciones en el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo con las pruebas realizadas, lo que sugiere que no todas las funciones dependientes de esta estructura cerebral se encuentran alteradas por el estado tiroideo del animal, ni por la reducción de la neurogénesis.

2.2.1 Reconocimiento de un objeto nuevo

En relación a la memoria visual, no se observaron diferencias entre los grupos experimentales en la tarea de reconocimiento de un objeto nuevo a largo plazo. Esta tarea depende de la funcionalidad del hipocampo (Myhrer, 1989). Este resultado indica que la disminución de la neurogénesis en el GD tras 6 semanas de hipotiroidismo no es suficiente para producir alteraciones en el desarrollo de esta tarea. En un estudio reciente se ha cuantificado una reducción de un 65% en la neurogénesis en el GD tras el tratamiento con un agente antimitótico. Además, la administración de esta droga impidió que se produjese el aumento en la memoria a largo plazo mediada por el enriquecimiento del medio y evaluada con la tarea de reconocimiento de un objeto nuevo (Bruehl-Jungerman y cols., 2005). Esto parece indicar que las nuevas neuronas granulares participan en este tipo de memoria. Sin embargo, en nuestro modelo de hipotiroidismo sólo se produce una reducción de un 30% en la neurogénesis, lo cual puede ser insuficiente para afectar a la memoria a largo plazo. Por otra parte, las drogas citostáticas tienen un amplio margen de efectos directos y secundarios que no son fácilmente distinguibles, por lo que el bloqueo de la formación de memorias utilizando estas drogas, podría no estar relacionado con la neurogénesis adulta.

Ratones con una mutación dominante negativa del TR α 1 presentan deficiencias en la memoria de reconocimiento visual evaluada con esta tarea, que sólo se normalizan tras un tratamiento crónico con dosis elevadas de T3 en el adulto. Estos animales tienen niveles eutiroideos de HT en plasma y cerebro y el tratamiento con dosis elevadas de T3 se utiliza para revertir la actividad dominante negativa del receptor mutado (Venero y cols., 2005). Es interesante resaltar que los

animales con esta mutación dominante del TR α 1 muestran una disminución de la densidad de terminales GABAérgicas de las células en cesto y candelabro en la región CA1 del hipocampo. Esta región juega un importante papel en la memoria de reconocimiento visual (Hammond y cols., 2004). En nuestro modelo experimental de hipotiroidismo adulto probablemente esta región del hipocampo no se afecte lo suficiente como para alterar la memoria visual evaluada mediante esta tarea. En cualquier caso, sería interesante explorar si la deficiencia en la activación transcripcional debida al hipotiroidismo adulto afecta a los circuitos inhibitorios del hipocampo y del GD.

2.2.2 Condicionamiento por miedo

El condicionamiento por miedo es una prueba que evalúa el aprendizaje y la memoria. No se observaron diferencias durante el entrenamiento en esta prueba, lo que indica que el hipotiroidismo no interfiere en la adquisición del condicionamiento.

La prueba de condicionamiento al sonido depende de la amígdala y no del hipocampo (Phillips y LeDoux, 1992). Los resultados de esta prueba apuntan a que la actividad de la amígdala se ve favorecida al cabo de 1 y 3 semanas por la ausencia de hormona. Este resultado podría deberse a una potenciación en la consolidación de la información emocional en los animales hipotiroideos. Sin embargo, el que no se observen diferencias entre los grupos a las 48h del entrenamiento no apoya esta posibilidad. Otra explicación sería que los animales hipotiroideos presentasen un déficit en la extinción de la memoria emocional en el tiempo. Sin embargo, con los experimentos realizados no podemos confirmarlo. En todo caso, esta potenciación de memorias emocionales implicaría una mala adaptación, dado que una información emocional de intensidad moderada se transforma en una memoria robusta y con una respuesta conductual de miedo exagerada. Esto sugiere que las ratas hipotiroideas podrían ser más susceptibles a memorias traumáticas.

El condicionamiento al contexto depende de la amígdala y además del hipocampo, el cual interviene en la formación de una representación integrada del contexto (Phillips y LeDoux, 1992; Maren y Holt, 2000). En esta prueba se aprecia que las ratas hipotiroideas recuerdan mejor a largo plazo (3 semanas). Por los resultados obtenidos con las pruebas anteriores, parece que este recuerdo negativo estaría potenciado por la actividad de la amígdala y no por la función hipocampal. Por tanto, la disminución de la neurogénesis en la ZSG no parece alterar la memoria dependiente del hipocampo.

3. Repercusión de los resultados obtenidos y perspectivas futuras

Nuestros resultados sugieren que los desórdenes del comportamiento depresivo provocados por el hipotiroidismo adulto en humanos pueden estar relacionados, entre otros factores, con la disminución de la neurogénesis en el GD. No sabemos si se pueden llegar a producir daños estructurales o funcionales permanentes en el GD al aumentar el periodo de hipotiroidismo o hacerlo repetidamente. Hay que tener en cuenta además que el hipotiroidismo es una enfermedad con elevada prevalencia y que en muchos casos tarda en diagnosticarse. Estos resultados podrían considerarse además en el diseño de los protocolos que incluyen la retirada de HT periódicamente durante varias semanas para el seguimiento del cáncer de tiroides con radioyodo después de la tiroidectomía quirúrgica.

Nuestros estudios pueden contribuir además a la detección, seguimiento y tratamiento de los desórdenes del comportamiento. En este sentido podría ser importante estudiar las consecuencias de la administración de HT en un modelo experimental de depresión eutiroides, analizando los efectos del tratamiento en la neurogénesis adulta y en el comportamiento.

Este trabajo también puede contribuir al desarrollo de futuras aplicaciones terapéuticas encaminadas a paliar daños cerebrales por activación de la neurogénesis endógena. Por ello sería interesante profundizar en el entendimiento de los mecanismos de acción de las HT en este proceso biológico.

CONCLUSIONES

1. El hipotiroidismo adulto inducido por tiroidectomía quirúrgica, incluso por un corto periodo de tiempo, es suficiente para provocar una disminución significativa de la proliferación en la zona subgranular del giro dentado.
2. El hipotiroidismo adulto también interfiere con la correcta maduración de los neuroblastos y neuronas inmaduras generadas *de novo* en el giro dentado, reduciendo su número, alterando su distribución y provocando una hipoplasia de su arbol dendrítico.
3. La disminución de la neurogénesis en el giro dentado por deficiencia de hormonas tiroideas no se explica por el aumento de la muerte celular en esta región, ni por variaciones de los niveles sistémicos de corticosterona.
4. La supervivencia celular en el giro dentado no parece estar afectada por el estado tiroideo del animal.
5. La disminución de la neurogénesis en el giro dentado adulto en condiciones de hipotiroidismo parece estar relacionada con alteraciones en el mantenimiento del estado de ánimo, específicamente con una tendencia al comportamiento de tipo depresivo.
6. El hipotiroidismo adulto sin embargo no interfiere con otras capacidades funcionales de la formación del hipocampo como la memoria visual y espacial.
7. El tratamiento crónico con hormonas tiroideas es capaz de revertir, en los mismos animales, las alteraciones en la capacidad proliferativa del giro dentado y la tendencia al comportamiento de tipo depresivo observadas en condiciones de hipotiroidismo. Sin embargo, el tratamiento agudo no puede revertir las anomalías conductuales. Esto indicaría que las hormonas tiroideas pueden influir en el comportamiento a través de la modulación de la neurogénesis adulta. Estos resultados sugieren además que los desórdenes del comportamiento provocados por el hipotiroidismo adulto en humanos podrían deberse, entre otros factores, a una disminución de la proliferación en el giro dentado.

8. A pesar de que con el reemplazo hormonal se revierten las alteraciones estudiadas, no se puede descartar la existencia de daños estructurales o funcionales permanentes debidos a la interrupción de la neurogénesis en el giro dentado durante el periodo de deficiencia hormonal. Esta posibilidad debería considerarse en los protocolos clínicos en los que la terapia de reemplazo hormonal se interrumpe durante varias semanas.

9. La modulación de la neurogénesis en el giro dentado adulto por hormonas tiroideas abre nuevas expectativas en el desarrollo de futuras terapias encaminadas a paliar daños neuronales por movilización de células madre endógenas. Nuestros resultados también abren nuevas vías de entendimiento sobre los mecanismos de acción de las hormonas tiroideas en los desórdenes depresivos. En ambos casos estas enfermedades tienen una elevada frecuencia en la población mundial.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:2896-2903.
- Abrous DN, Adriani W, Montaron MF, Aurousseau C, Rougon G, Le Moal M, Piazza PV (2002) Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci* 22:3656-3662.
- Aggleton JP (1993) The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends Neurosci* 16:328-333.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.
- Altman J (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145:573-591.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Altshuler LL, Bauer M, Frye MA, Gitlin MJ, Mintz J, Szuba MP, Leight KL, Whybrow PC (2001) Does thyroid supplementation accelerate tricyclic antidepressant response? A review and meta-analysis of the literature. *Am J Psychiatry* 158:1617-1622.
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686.
- Ambrogini P, Cuppini R, Ferri P, Mancini C, Ciaroni S, Voci A, Gerdoni E, Gallo G (2005) Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology* 81:244-253.
- Aranda A, Pascual A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269-1304.
- Aronson R, Offman HJ, Joffe RT, Naylor CD (1996) Triiodothyronine augmentation in the treatment of refractory depression. A meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 53:842-848.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.
- Ashtari M, Greenwald BS, Kramer-Ginsberg E, Hu J, Wu H, Patel M, Aupperle P, Pollack S (1999) Hippocampal/amygdala volumes in geriatric depression. *Psychol Med* 29:629-638.

- Axelsson DA, Doraiswamy PM, McDonald WM, Boyko OB, Tupler LA, Patterson LJ, Nemeroff CB, Ellinwood EH, Jr., Krishnan KR (1993) Hypercortisolemia and hippocampal changes in depression. *Psychiatry Res* 47:163-173.
- Baas D, Bourbeau D, Sarlieve LL, Ittel ME, Dussault JH, Puymirat J (1997) Oligodendrocyte maturation and progenitor cell proliferation are independently regulated by thyroid hormone. *Glia* 19:324-332.
- Baez M, Volosin M (1994) Corticosterone influences forced swim-induced immobility. *Pharmacol Biochem Behav* 49:729-736.
- Banasr M, Hery M, Brezun JM, Daszuta A (2001) Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 14:1417-1424.
- Barrera-Hernandez G, Park KS, Dace A, Zhan Q, Cheng SY (1999) Thyroid hormone-induced cell proliferation in GC cells is mediated by changes in G1 cyclin/cyclin-dependent kinase levels and activity. *Endocrinology* 140:5267-5274.
- Bauer S, Moyse E, Jourdan F, Colpaert F, Martel JC, Marien M (2003) Effects of the alpha 2-adrenoreceptor antagonist dexefaroxan on neurogenesis in the olfactory bulb of the adult rat in vivo: selective protection against neuronal death. *Neuroscience* 117:281-291.
- Bazin N, Perruchet P, De Bonis M, Feline A (1994) The dissociation of explicit and implicit memory in depressed patients. *Psychol Med* 24:239-245.
- Berbel P, Guadaño-Ferraz A, Angulo A, Ramón Cerezo J (1994) Role of thyroid hormones in the maturation of interhemispheric connections in rats. *Behav Brain Res* 64:9-14.
- Berbel P, Ausó E, García-Velasco JV, Molina ML, Camacho M (2001) Role of thyroid hormones in the maturation and organisation of rat barrel cortex. *Neuroscience* 107:383-394.
- Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ (2005) Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146:2864-2871.
- Bernal J (2005) Thyroid hormones and brain development. *Vitam Horm* 71:95-122.
- Bernal J, Guadaño-Ferraz A (1998) Thyroid hormone and the development of the brain. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 5:296-302.
- Berry MJ, Kates AL, Larsen PR (1990) Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol Endocrinol* 4:743-748.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:357-374.

- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ (1995) Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci* 15:61-69.
- Boyages SC (1996) The neuromuscular system and brain in hypothyroidism. In: Werner and Ingbar's "The Thyroid: A fundamental and clinical text", 7th Edition (Braverman L, Utiger R, eds), pp 631-633. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Bradley DJ, Towle HC, Young WS, 3rd (1992) Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 12:2288-2302.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157:115-118.
- Brezun JM, Daszuta A (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89:999-1002.
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG (2003a) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 17:2042-2046.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003b) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1-10.
- Brown TH, Zador AM (1990) The hippocampus. In: Synaptic organization of the brain (Shepherd G, ed), pp 346-388. New York: Oxford University Press.
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C (2005) New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 21:513-521.
- Bunevicius R, Kazanavicius G, Zalinkevicius R, Prange AJ, Jr. (1999) Effects of thyroxine as compared with thyroxine plus triiodothyronine in patients with hypothyroidism. *N Engl J Med* 340:424-429.
- Burek MJ, Oppenheim RW (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 6:427-446.
- Calvo RM, Jauniaux E, Gulbis B, Asuncion M, Gervy C, Contempre B, Morreale de Escobar G (2002) Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1768-1777.

- Calza L, Aloe L, Giardino L (1997) Thyroid hormone-induced plasticity in the adult rat brain. *Brain Res Bull* 44:549-557.
- Cameron HA, Gould E (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61:203-209.
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435:406-417.
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15:4687-4692.
- Cameron HA, Tanapat P, Gould E (1998) Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* 82:349-354.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.
- Carlson DJ, Strait KA, Schwartz HL, Oppenheimer JH (1996) Thyroid hormone receptor isoform content in cultured type 1 and type 2 astrocytes. *Endocrinology* 137:911-917.
- Carre JL, Demerens C, Rodriguez-Peña A, Floch HH, Vincendon G, Sarlieve LL (1998) Thyroid hormone receptor isoforms are sequentially expressed in oligodendrocyte lineage cells during rat cerebral development. *J Neurosci Res* 54:584-594.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1-14.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16:2649-2658.
- Chapa F, Kunnecke B, Calvo R, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G, Cerdán S (1995) Adult-onset hypothyroidism and the cerebral metabolism of (1,2-¹³C₂) acetate as detected by ¹³C nuclear magnetic resonance. *Endocrinology* 136:296-305.
- Chomez P, Neveu I, Mansen A, Kiesler E, Larsson L, Vennström B, Arenas E (2000) Increased cell death and delayed development in the cerebellum of mice lacking the rev-erbA(alpha) orphan receptor. *Development* 127:1489-1498.
- Christie BR, Cameron HA (2006) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* 16:199-207.

- Davis PJ, Shih A, Lin HY, Martino LJ, Davis FB (2000) Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem* 275:38032-38039.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (2003) Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460:563-572.
- Desouza LA, Ladiwala U, Daniel SM, Agashe S, Vaidya RA, Vaidya VA (2005) Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 29:414-426.
- Deuel TA, Liu JS, Corbo JC, Yoo SY, Rorke-Adams LB, Walsh CA (2006) Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron* 49:41-53.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Duman RS (2004) Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 56:140-145.
- Duman RS, Malberg J, Nakagawa S (2001) Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther* 299:401-407.
- Eayrs JT (1955) The cerebral cortex of normal and hypothyroid rats. *Acta Anat (Basel)* 25:160-183.
- Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ (2000) Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7579-7584.
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Escámez MJ, Guadaño-Ferraz A, Cuadrado A, Bernal J (1999) Type 3 iodothyronine deiodinase is selectively expressed in areas related to sexual differentiation in the newborn rat brain. *Endocrinology* 140:5443-5446.
- Escobar-Morreale HF, del Rey FE, Obregón MJ, de Escobar GM (1996) Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. *Endocrinology* 137:2490-2502.

- Fernández M, Pirondi S, Manservigi M, Giardino L, Calza L (2004) Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat. *Eur J Neurosci* 20:2059-2070.
- Freedman LP (1992) Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 13:129-145.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11879-11883.
- Giardino L, Bettelli C, Calza L (2000) In vivo regulation of precursor cells in the subventricular zone of adult rat brain by thyroid hormone and retinoids. *Neurosci Lett* 295:17-20.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257-271.
- Gloger S, Fardella C, Santis R, Bitran J (1997) [Relevance of the thyroid function assessment in psychiatric patients]. *Rev Med Chil* 125:1351-1356.
- Gold MS, Pottash AL, Extein I (1981) Hypothyroidism and depression. Evidence from complete thyroid function evaluation. *Jama* 245:1919-1922.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2390-2394.
- Gordon JT, Crutchfield FL, Jennings AS, Dratman MB (1982) Preparation of lipid-free tissue extracts for chromatographic determination of thyroid hormones and metabolites. *Arch Biochem Biophys* 216:407-415.
- Gould E, Tanapat P (1997) Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80:427-436.
- Gould E, Woolley CS, McEwen BS (1991) The hippocampal formation: morphological changes induced by thyroid, gonadal and adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinology* 16:67-84.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999a) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286:548-552.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999b) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260-265.
- Guadaño-Ferraz A, Escamez MJ, Rausell E, Bernal J (1999) Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J Neurosci* 19:3430-3439.
- Guadaño-Ferraz A, Obregón MJ, St Germain DL, Bernal J (1997a) The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10391-10396.

- Guadaño-Ferraz A, Escámez MJ, Morte B, Vargiu P, Bernal J (1997b) Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 49:37-44.
- Guadaño-Ferraz A, Benavides-Piccione R, Venero C, Lancha C, Vennström B, Sandi C, DeFelipe J, Bernal J (2003) Lack of thyroid hormone receptor alpha1 is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry* 8:30-38.
- Guadaño Ferraz A, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G, Innocenti GM, Berbel P (1994) The development of the anterior commissure in normal and hypothyroid rats. *Brain Res Dev Brain Res* 81:293-308.
- Haggerty JJ, Jr., Prange AJ, Jr. (1995) Borderline hypothyroidism and depression. *Annu Rev Med* 46:37-46.
- Hammond RS, Tull LE, Stackman RW (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 82:26-34.
- Harmer CJ, Clark L, Grayson L, Goodwin GM (2002) Sustained attention deficit in bipolar disorder is not a working memory impairment in disguise. *Neuropsychologia* 40:1586-1590.
- Harvey CB, Williams GR (2002) Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid* 12:441-446.
- Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol* 46:867-877.
- Herrera DG, Yagüe AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, García-Verdugo JM (2003) Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7919-7924.
- Holsberger DR, Jirawatnotai S, Kiyokawa H, Cooke PS (2003) Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology* 144:3732-3738.
- Howly RH (1993) Thyroid dysfunction in refractory depression: implications for pathophysiology and treatment. *J Clin Psychiatry* 54:47-54.
- Jansen J, Friesema EC, Milici C, Visser TJ (2005) Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* 15:757-768.
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X (2005) Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 115:3104-3116.
- Jin K, Mao XO, Sun Y, Xie L, Jin L, Nishi E, Klagsbrun M, Greenberg DA (2002) Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia-inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo. *J Neurosci* 22:5365-5373.

- Joffe RT (2002) Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. In: *Hormones, Brain, and Behavior* (Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R, eds), pp 867-881. San Diego: Academic Press.
- Joffe RT, Singer W (1990) A comparison of triiodothyronine and thyroxine in the potentiation of tricyclic antidepressants. *Psychiatry Res* 32:241-251.
- Joffe RT, Levitt AJ (1993) The thyroid and depression. In: *The Thyroid Axis and Psychiatric Illness* (Joffe RT, Levitt AJ, eds), pp 195-253. Washington: American Psychiatric Press.
- Johansson CB, Momba S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Johnson N, Krebs M, Boudreau R, Giorgi G, LeGros M, Larabell C (2003) Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. *Differentiation* 71:414-424.
- Johnson SA, Fournier NM, Kalynchuk LE (2006) Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav Brain Res* 168:280-288.
- Kamilaris TC, DeBold CR, Johnson EO, Mamalaki E, Listwak SJ, Calogero AE, Kalogeras KT, Gold PW, Orth DN (1991) Effects of short and long duration hypothyroidism and hyperthyroidism on the plasma adrenocorticotropin and corticosterone responses to ovine corticotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 128:2567-2576.
- Kaplan MM, Yaskoski KA (1981) Maturational patterns of iodothyronine phenolic and tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum, and hypothalamus. *J Clin Invest* 67:1208-1214.
- Kaplan MS (1985) Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. *Ann N Y Acad Sci* 457:173-192.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Karishma KK, Herbert J (2002) Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur J Neurosci* 16:445-453.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115:97-105.
- Kempermann G (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22:635-638.
- Kempermann G, Kronenberg G (2003) Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* 54:499-503.

- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004) Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14:186-191.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.
- Kirkegaard C, Faber J (1998) The role of thyroid hormones in depression. *Eur J Endocrinol* 138:1-9.
- Kjeld JM, Kuku SF, Diamant L, Fraser TR, Joplin GF, Mashiter K (1975) Production and storage of (125-I) thyroxine and (125-I) triiodothyronine of high specific activity. *Clin Chim Acta* 61:381-389.
- Köhrle J (2002) Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol* 347:125-167.
- Kolb B (1999) Towards an ecology of cortical organization: experience and the changing brain. In: *Neuronal plasticity: building a bridge from the laboratory to the clinic.* (Grafman J, Christen Y, eds), pp 173-174. Berlin: Springer-Verlag.
- Kornack DR, Rakic P (2001) Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294:2127-2130.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Kulikov A, Torresani J, Jeanningros R (1997) Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. *Neurosci Lett* 234:111-114.
- Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA (2002) Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 16:2008-2012.
- Lafarga M, Berciano MT, Garcia-Segura LM, Andres MA, Carmo-Fonseca M (1998) Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. *J Neurocytol* 27:205-217.
- Lauder JM (1979) Granule cell migration in developing rat cerebellum. Influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *Dev Biol* 70:105-115.
- Lazar MA (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 14:184-193.

- Lazar MA, Hodin RA, Darling DS, Chin WW (1989) A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite stry of the rat c-erbA alpha transcriptional unit. *Mol Cell Biol* 9:1128-1136.
- LeDoux JE (1993) Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res* 58:69-79.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82:1367-1375.
- Legry J, Selme-Matrat M, Rabie A, Clos J, Legry C (1976) Thyroid hormone and cell formation in the developing rat cerebellum. *Biol Neonate* 29:368-380.
- Lemkine GF, Raji A, Alfama G, Turque N, Hassani Z, Alegria-Prevot O, Samarut J, Levi G, Demeneix BA (2005) Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *Faseb J* 19:863-865.
- Li Q, Sachs L, Shi YB, Wolffe AP (1999) Modification of Chromatin Structure by the Thyroid Hormone Receptor. *Trends Endocrinol Metab* 10:157-164.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2074-2077.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS (1994) Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res* 639:167-170.
- Luine VN, Richards ST, Wu VY, Beck KD (1998) Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav* 34:149-162.
- Lupien SJ, McEwen BS (1997) The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev* 24:1-27.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.
- Madeira MD, Cadete-Leite A, Andrade JP, Paula-Barbosa MM (1991) Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adult rats: a morphometric study. *J Comp Neurol* 314:171-186.
- Madeira MD, Sousa N, Lima-Andrade MT, Calheiros F, Cadete-Leite A, Paula-Barbosa MM (1992) Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. *J Comp Neurol* 322:501-518.

- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955.
- Malberg JE (2004) Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci* 29:196-205.
- Malberg JE, Duman RS (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28:1562-1571.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-9110.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7:541-547.
- Manzano J, Morte B, Scanlan TS, Bernal J (2003) Differential effects of triiodothyronine and the thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 on thyroid hormone target genes in the brain. *Endocrinology* 144:5480-5487.
- Maren S (1996) Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol Neurobiol* 13:1-22.
- Maren S, Holt W (2000) The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behav Brain Res* 110:97-108.
- Martínez-Galán JR, Pedraza P, Santacana M, Escobar del Ray F, Morreale de Escobar G, Ruiz-Marcos A (1997) Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. *J Clin Invest* 99:2701-2709.
- Martinez R, Gomes FC (2005) Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase A pathway. *J Neurosci Res* 80:341-349.
- McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13508-13514.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.
- Mishkin M, Suzuki WA, Gadian DG, Vargha-Khadem F (1997) Hierarchical organization of cognitive memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:1461-1467.
- Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushima S, Matsubara K, Toyoshima K, Yamamoto T (1989) Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* 57:31-39.

- Montaron MF, Petry KG, Rodriguez JJ, Marinelli M, Aurousseau C, Rougon G, Le Moal M, Abrous DN (1999) Adrenalectomy increases neurogenesis but not PSA-NCAM expression in aged dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 11:1479-1485.
- Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol Aging* 27:645-654.
- Morreale de Escobar G, Obregón MJ, Escobar del Rey F (2004) Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Practice & Research in Clinical Endocrinology and Metabolism* 18:225-248.
- Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregón MJ, Escobar del Rey F (1985) Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 117:1890-1900.
- Morreale de Escobar G, Calvo R, Escobar del Rey F, Obregón MJ (1994) Thyroid hormones in tissues from fetal and adult rats. *Endocrinology* 134:2410-2415.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.
- Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennström B, Bernal J (2002) Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3985-3989.
- Myhrer T (1988) The role of medial and lateral hippocampal perforant path lesions and object distinctiveness in rats' reaction to novelty. *Physiol Behav* 42:371-377.
- Myhrer T (1989) Exploratory behavior, reaction to novelty, and proactive memory in rats with temporo-entorhinal connections disrupted. *Physiol Behav* 45:431-436.
- Nacher J, Crespo C, McEwen BS (2001) Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci* 14:629-644.
- Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS (2002) Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 22:3673-3682.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.
- Navascues J, Berciano MT, Tucker KE, Lafarga M, Matera AG (2004) Targeting SMN to Cajal bodies and nuclear gems during neuritogenesis. *Chromosoma* 112:398-409.

- Ng L, Hurley JB, Dierks B, Srinivas M, Salto C, Vennström B, Reh TA, Forrest D (2001) A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet* 27:94-98.
- Nixon K, Crews FT (2004) Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *J Neurosci* 24:9714-9722.
- Norberg J, Kristensen BW, Zimmer J (1999) Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc* 3:278-290.
- Nunez J, Couchie D, Brion JP (1989) Microtubule assembly: Regulation by thyroid hormones. In: *Iodine and the Brain* (DeLong GR, Robbins J, Condliffe PG, eds). New York: Plenum Press.
- Nunez J, Couchie D, Aniello F, Bridoux AM (1991) Regulation by thyroid hormone of microtubule assembly and neuronal differentiation. *Neurochem Res* 16:975-982.
- Nygard M, Wahlstrom GM, Gustafsson MV, Tokumoto YM, Bondesson M (2003) Hormone-dependent repression of the E2F-1 gene by thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 17:79-92.
- Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Calvo R, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G (1991) Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology* 129:2663-2673.
- Obregón MJ, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F (1978) Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology* 103:2145-2153.
- Obregón MJ, Mallol J, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G (1981) Presence of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in tissues from thyroidectomized rats. *Endocrinology* 109:908-913.
- Oomen HA, Schipperijn AJ, Drexhage HA (1996) The prevalence of affective disorder and in particular of a rapid cycling of bipolar disorder in patients with abnormal thyroid function tests. *Clin Endocrinol (Oxf)* 45:215-223.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH (1995) FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6:474-486.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.
- Paton JA, Nottebohm FN (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225:1046-1048.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London: Academic Press, Inc.

- Perez-Juste G, Aranda A (1999) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J Biol Chem* 274:5026-5031.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-6113.
- Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS (2003) Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 17:879-886.
- Pham K, McEwen BS, LeDoux JE, Nader K (2005) Fear learning transiently impairs hippocampal cell proliferation. *Neuroscience* 130:17-24.
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274-285.
- Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Cossu C, Simbula G, Menegazzi M, Shinozuka H, Columbano A (2001) Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3). *Faseb J* 15:1006-1013.
- Porsolt R, Lenegre A, McArthur R (1991) Pharmacological models of depression. In: *Animal Models in Psychopharmacology* (Olivier B, Mos J, Slangen JL, eds), pp 137-159. Basel: Birkhauser.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732.
- Prange AJ, Jr. (1996) Novel uses of thyroid hormones in patients with affective disorders. *Thyroid* 6:537-543.
- Prange AJ, Jr., Wilson IC, Rabon AM, Lipton MA (1969) Enhancement of imipramine antidepressant activity by thyroid hormone. *Am J Psychiatry* 126:457-469.
- Prange AJ, Jr., Wilson IC, Lynn CW, Alltop LB, Stikeleather RA (1974) L-tryptophan in mania. Contribution to a permissive hypothesis of affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* 30:56-62.
- Puymirat J, Miehé M, Marchy R, Sarlieve L, Dussault JH (1991) Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. *Thyroid* 1:173-184.
- Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, González-Pérez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodríguez R, Berger MS, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494:415-434.

- Rabie A, Patel AJ, Clavel MC, Legry J (1979) Effect of thyroid deficiency on the growth of the hippocampus in the rat. A combined biochemical and morphological study. *Dev Neurosci* 2:183-194.
- Rami A, Patel AJ, Rabie A (1986a) Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: morphological alterations in granule and pyramidal cells. *Neuroscience* 19:1217-1226.
- Rami A, Rabie A, Patel AJ (1986b) Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: cell acquisition in the dentate gyrus. *Neuroscience* 19:1207-1216.
- Ramón y Cajal S (1905) *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos, adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos*. Madrid: Imprenta y Librería de Nicolás Moya.
- Ramón y Cajal S (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Paris.
- Ramón y Cajal S (1914) *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso*. Madrid: Hijos de Nicolás Moya.
- Rao MS, Shetty AK (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19:234-246.
- Redei EE, Ahmadiyeh N, Baum AE, Sasso DA, Slone JL, Solberg LC, Will CC, Volenec A (2001) Novel animal models of affective disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 6:43-67.
- Reif A, Schmitt A, Fritzen S, Chourbaji S, Bartsch C, Urani A, Wycislo M, Mossner R, Sommer C, Gass P, Lesch KP (2004) Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour. *Eur J Neurosci* 20:885-895.
- Ribak CE, Korn MJ, Shan Z, Obenaus A (2004) Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. *Brain Res* 1000:195-199.
- Rocheffort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22:2679-2689.
- Roediger HL, 3rd, McDermott KB (1992) Depression and implicit memory: a commentary. *J Abnorm Psychol* 101:587-591.
- Rozanov CB, Dratman MB (1996) Immunohistochemical mapping of brain triiodothyronine reveals prominent localization in central noradrenergic systems. *Neuroscience* 74:897-915.

- Ruiz-Marcos A, Sanchez-Toscano F, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G (1980) Reversible morphological alterations of cortical neurons in juvenile and adult hypothyroidism in the rat. *Brain Res* 185:91-102.
- Ruiz-Marcos A, Cartagena Abella P, García García A, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G (1988) Rapid effects of adult-onset hypothyroidism on dendritic spines of pyramidal cells of the rat cerebral cortex. *Exp Brain Res* 73:583-588.
- Ruiz de Oña C, Morreale de Escobar G, Calvo R, Escobar del Rey F, Obregón MJ (1991) Thyroid hormones and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation: effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology* 128:422-432.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-744.
- Sandrini M, Vitale G, Vergoni AV, Ottani A, Bertolini A (1996) Effect of acute and chronic treatment with triiodothyronine on serotonin levels and serotonergic receptor subtypes in the rat brain. *Life Sci* 58:1551-1559.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-522.
- Sensenbach W, Madison L, Eisenberg S, Ochs L (1954) The cerebral circulation and metabolism in hyperthyroidism and myxedema. *J Clin Invest* 33:1434-1440.
- Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359-378.

- Shah PJ, Ebmeier KP, Glabus MF, Goodwin GM (1998) Cortical grey matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression. Controlled magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry* 172:527-532.
- Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH (1999) Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci* 19:5034-5043.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3908-3913.
- Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH (2000) Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20:8727-8735.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299:117-120.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12:578-584.
- Silva JE, Matthews PS (1984) Production rates and turnover of triiodothyronine in rat-developing cerebral cortex and cerebellum. Responses to hypothyroidism. *J Clin Invest* 74:1035-1049.
- Singhal RL, Rastogi RB, Hrdina PD (1975) Brain biogenic amines and altered thyroid function. *Life Sci* 17:1617-1626.
- Sousa N, Madeira MD, Paula-Barbosa MM (1998) Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study. *Brain Res* 794:199-210.
- Stein SA, Adams PM, Shanklin DR, Mihailoff GA, Palnitkar MB (1990) Thyroid hormone control of brain and motor development: molecular, neuroanatomical, and behavioral studies. In: *Advances in Perinatal Thyroidology* (Bercu BB, Shulman DI, eds), pp 47-105. New York: Plenum Press.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G (2004) Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46:41-52.
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627.
- Surks MI, Oppenheimer JH (1977) Concentration of L-thyroxine and L-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat liver and kidney. Quantitative evidence favoring a major role of T3 in thyroid hormone action. *J Clin Invest* 60:555-562.

- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792-5801.
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437:496-504.
- Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, Moskowitz MA (2003) EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest* 111:1125-1132.
- Trentin AG, De Aguiar CB, Garcez RC, Alvarez-Silva M (2003) Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion. *Glia* 42:359-369.
- Uchida K, Yonezawa M, Nakamura S, Kobayashi T, Machida T (2005) Impaired neurogenesis in the growth-retarded mouse is reversed by T3 treatment. *Neuroreport* 16:103-106.
- Vakili K, Pillay SS, Lafer B, Fava M, Renshaw PF, Bonello-Cintron CM, Yurgelun-Todd DA (2000) Hippocampal volume in primary unipolar major depression: a magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry* 47:1087-1090.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13427-13431.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Vanderpump MP, Tunbridge WM (2002) Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 12:839-847.
- Venero C, Guadaño-Ferraz A, Herrero AI, Nordström K, Manzano J, de Escobar GM, Bernal J, Vennström B (2005) Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor alpha1 can be ameliorated by T3 treatment. *Genes Dev* 19:2152-2163.
- Weeke J, Orskov H (1973) Synthesis of 125I monolabelled 3, 5, 3'-triiodothyronine and thyroxine of maximum specific activity for radioimmunoassay. *Scy J Clin Lab Invest* 32:357-360.
- Weeke J, Orskov H (1975) Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scy J Clin Lab Invest* 35:237-244.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16:7599-7609.

- WHO (1990) Report to the 43rd World Health Assembly. In: World Health Organization Features. Ginebra.
- Whybrow PC (1996) Behavioral and psychiatric manifestations of hypothyroidism. In: Werner and Ingbar's "The thyroid: a fundamental and clinical text", 7th Edition (Braverman L, Utiger R, eds), pp 866-870. Philadelphia: Lippincott-Ravm.
- Whybrow PC, Prange AJ, Jr. (1981) A hypothesis of thyroid-catecholamine-receptor interaction. Its relevance to affective illness. *Arch Gen Psychiatry* 38:106-113.
- Williams RW, Rakic P (1988) Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 278:344-352.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G (2001) Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol* 26:67-77.
- Yen PM (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81:1097-1142.
- Zakzanis KK, Leach L, Kaplan E (1998) On the nature and pattern of neurocognitive function in major depressive disorder. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 11:111-119.
- Zarrow MX, Yochim JM, McCarthy JL (1964) *Experimental Endocrinology: A Sourcebook of Basic Techniques*. London: Academic Press, Inc.
- Zoeller RT (2003) Transplacental thyroxine and fetal brain development. *J Clin Invest* 111:954-957.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Ramus SJ (1994) Severity of memory impairment in monkeys as a function of locus and extent of damage within the medial temporal lobe memory system. *Hippocampus* 4:483-495.

ANEXO 1
PUBLICACIONES
RELACIONADAS

ORIGINAL ARTICLE

Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior

A Montero-Pedrazuela¹, C Venero², R Lavado-Autric¹, I Fernández-Lamo¹, JM García-Verdugo³, J Bernal¹ and A Guadaño-Ferraz¹

¹Department of Molecular Endocrinology, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ²Department of Psychobiology, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, Spain and ³Laboratorio de Morfología Celular, Unidad Mixta CIPF-UEG, Valencia, Spain

Hormonal imbalances are involved in many of the age-related pathologies, as neurodegenerative and psychiatric diseases. Specifically, thyroid state alterations in the adult are related to psychological changes and mood disorders as depression. The dentate gyrus of the hippocampal formation undergoes neurogenesis in adult mammals including humans. Recent evidence suggests that depressive disorders and their treatment are tightly related to the number of newly born neurons in the dentate gyrus. We have studied the effect of thyroid hormones (TH) on hippocampal neurogenesis in adult rats *in vivo*. A short period of adult-onset hypothyroidism impaired normal neurogenesis in the subgranular zone of the dentate gyrus with a 30% reduction in the number of proliferating cells. Hypothyroidism also reduced the number of newborn neuroblasts and immature neurons (doublecortin (DCX) immunopositive cells) which had a severely hypoplastic dendritic arborization. To correlate these changes with hippocampal function, we subjected the rats to the forced swimming and novel object recognition tests. Hypothyroid rats showed normal memory in object recognition, but displayed abnormal behavior in the forced swimming test, indicating a depressive-like disorder. Chronic treatment of hypothyroid rats with TH not only normalized the abnormal behavior but also restored the number of proliferative and DCX-positive cells, and induced growth of their dendritic trees. Therefore, hypothyroidism induced a reversible depressive-like disorder, which correlated to changes in neurogenesis. Our results indicate that TH are essential for adult hippocampal neurogenesis and suggest that mood disorders related to adult-onset hypothyroidism in humans could be due, in part, to impaired neurogenesis.

Molecular Psychiatry advance online publication, 31 January 2006; doi:10.1038/sj.mp.4001802

Keywords: thyroid hormones; adult neurogenesis; dentate gyrus; proliferation; doublecortin; depressive disorder

Introduction

Hormonal imbalances are involved in many age-related pathologies, such as neurodegenerative and psychiatric disorders. Hypothyroidism is a prevalent condition in humans with an incidence of 8% in the adult population.¹ The clinical picture includes cognitive, attention, and mood disorders such as depression, in many cases suggesting hippocampal alterations. Most symptoms usually remit after TH replacement, but some may persist, especially after prolonged hypothyroidism.² The mechanisms responsible for these alterations have not been clarified, although many studies point out to disturbances in neurotransmission mainly affecting noradrenergic,

serotonergic, and GABAergic systems.³ Mood disorders have a complex etiology, and the understanding of the biological processes affected is of clinical relevance. Recent evidence suggests that depressive disorders and their response to treatment are tightly related to the number of newly born neurons in the dentate gyrus (DG).^{4,5}

Adult neurogenesis takes place in two main neurogenic areas: the subventricular zone (SVZ) adjacent to the lateral ventricles which generates olfactory bulb interneurons, and the subgranular zone (SGZ) which gives rise to granular neurons in the hippocampal DG.^{6–9}

In the DG, granular neurons are generated throughout adulthood from progenitor cells within tight proliferative clusters located around small capillaries in the SGZ.¹⁰ The neuroblasts then migrate a short distance to the granular layer and differentiate to mature granular neurons. Newly generated neuroblasts and immature neurons in the adult DG specifically express doublecortin (DCX),¹¹ a

Correspondence: Dr A Guadaño-Ferraz, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, E-28029 Madrid, Spain.

E-mail: aguadano@iib.uam.es

Received 25 October 2005; revised 19 December 2005; accepted 3 January 2006

microtubule-associated phosphoprotein also expressed in migrating neuroblasts and immature neurons during development. Most importantly, newly born granular neurons are incorporated into the neural circuitry and mature into functional neurons.¹² The specific function of these neurons is not yet clear,¹³ but some hippocampus-dependent learning and memory tasks have been related to an increased neurogenesis,^{14,15} suggesting that they might contribute to cognitive processes.

Cell proliferation in the adult hippocampus is decreased in several animal models of stress and depression.^{5,16,17} The mechanisms controlling progenitor cell and neuroblast proliferation have not been clarified but circulating factors, including hormones, may play a role. As an example, IGF-I is needed to induce hippocampal proliferation by physical exercise,¹⁸ and stress-elevated circulating levels of adrenal steroids inhibit the production of new granular neurons.¹⁶

Thyroid hormones (TH: thyroxine (T4) and 3,5,3'-triiodothyronine (T3)) are essential for brain development and function.¹⁹ In particular, in the hippocampus, TH deficiency causes reduced growth, reduced number of cells in the DG, and abnormal neuronal migration and maturation.^{20–22} TH action is mediated through T3 nuclear receptors, and T3 receptor deficiency or mutations also alter adult hippocampal structure and hippocampus-dependent behavior.^{23,24} Very recently, TH have been implicated in adult neurogenesis,^{25–28} but little is known on the functional consequences of TH actions on proliferation of neuronal progenitors.

In this paper, we show that short-term adult-onset hypothyroidism significantly reduces SGZ proliferative capacity and impairs dendritic arborization of immature neurons. In addition, hypothyroid animals display a depressive-like behavior. All these alterations are reversed by chronic TH treatment. Our findings suggest that in humans, the mood disorders secondary to adult hypothyroidism could be related, at least in part, to the impairment of hippocampal proliferation. These results are relevant for the handling of hypothyroid patients and, in particular, to the design of clinical protocols that include TH withdrawal.

Materials and methods

Animals and treatments

Adult male Wistar rats were housed in temperature-controlled animal quarters with automatic light/dark cycles of 14/10 h, following European Community guidelines and approval by the ethics committee of our institution. Three experimental groups were analyzed: euthyroid (E), hypothyroid (H), and TH-treated, hypothyroid animals (Recovery group, or R). The studies were performed on postnatal day 95 (P95) both in hypothyroid rats (P95H) and sham-operated euthyroid controls (P95E). In addition, a group of hypothyroid rats was treated with TH from P95 to

P120 (P120R) and compared with untreated hypothyroid (P120H) and euthyroid controls (P120E). Hypothyroidism was induced in all cases at P75 by surgical thyroidectomy. We followed a method used through the years in our laboratory,^{29,30} based on the original procedure by Zarrow *et al.*³¹ but leaving the parathyroids intact (see Supplementary data). Thyroidectomized rats, both untreated and treated, were fed a low iodine diet starting the day of surgery.²¹ At the time of killing, both P95 and P120 thyroidectomized rats had greatly decreased T4 and T3 in serum and liver (serum T4 < 1.1 ng/ml and T3 < 0.08 ng/ml; liver T4 < 2.1 ng/g and T3 < 0.70 ng/g), a significant reduction in body weight (BW; $P < 0.001$), and a 66% reduction of liver type 1 deiodinase (D1) mRNA expression³² with respect to sham-operated controls. TH treatment consisted in the administration of a physiological combination of T4 and T3 in the drinking water (0.18 μ g T4/ml and 0.03 μ g T3/ml). This procedure was based on previous data.³³ The solution was prepared daily in sterile 0.01% bovine serum albumin and kept in the dark to avoid hormone degradation. The hormonal concentration in the drinking water was calculated, on the basis of fluid intake, to provide 2.4 μ g T4 and 0.4 μ g T3 /100 g BW/day. TH treatment resulted in a significant increase in BW and in serum and liver T4 and T3 ($P < 0.001$ versus P120H). D1 mRNA was fourfold increased by TH treatment. Thyroidal status affected neither brain size (not shown) nor DG volume (in mm³, P95E = 0.75; P95H = 0.69; P120E = 0.90; P120H = 0.76; P120R = 0.80; $P > 0.05$ in all cases) (see Supplementary Figure 1).

To evaluate the acute effects of TH on the reversal of depressive-like behavior, we analyzed two additional groups of hypothyroid-treated animals with their corresponding E and H counterparts. One group (P120I) received one single i.p. injection of 24 μ g T4 plus 4 μ g T3 /100 g BW, that is, 10-fold the daily dose used for the recovery group under chronic treatment. The hormone combination was administered to each animal just after the training session of the Porsolt swimming test (see below) and, therefore, 24 h before the test. The second group (P120W) received the hormone combination in the drinking water at the same dosage as the chronic-treated (P120R) animals starting 24 h before the training, that is, 48 h before the behavioral test session. To compare the results of both conditions, the animals of this group also received a single injection of vehicle just after the training. Similarly, the P120E and P120H counterparts for this experiment also received the vehicle injection.

Rats were housed in groups of three animals per cage and were habituated to experimental handling for several days before behavioral testing. The tests were conducted between 0800 and 1330 hours. For cell proliferation analysis, the animals received 4 i.p. injections spaced every 2 h of 40 mg/kg BW BrdU, an S-phase marker thymidine analog, and they were killed 24 h after the first injection.^{34–37} Rats subjected to behavioral testing received the BrdU injections 2

days after concluding the tests so as to avoid stress-induced influences on cell proliferation.³⁸ For immunohistochemistry, the rats were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB and the brains were serially sectioned on a vibratome at 50 μ m in the coronal plane.

Hormonal determinations

On the day of killing, blood and livers were obtained from every animal to measure T3 and T4 levels following previously established methods.³⁹ Plasma corticosterone was also measured using a RIA kit (Coat-A-Count, Diagnostics Products Corp., CA, USA; sensitivity 5.9 ng/ml).

Immunohistochemistry

Specific markers were used to analyze cellular proliferation (mouse antibody anti-BrdU, 1:100; Dako, Carpinteria, CA, USA; mouse anti-Ki67, 1:100; Novocastra Labs Ltd., Newcastle, UK). DCX expression (goat polyclonal antibody anti-DCX, 1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) was used as a marker of newly generated neurons in the SGZ.^{40,41} Apoptosis was evaluated using a rabbit polyclonal antibody anti-cleaved caspase-3 (1:500; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), and with the TUNEL assay (Apoptag apoptosis detection kit, Chemicon, Temecula, CA, USA) following the manufacturer's directions. Biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) were used at a 1:200 dilution. The immune signal was developed using the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St Louis, MO, USA) and H₂O₂ as peroxidase substrates. For fluorescent immunohistochemistry, the biotinylated secondary antibody was detected with streptavidin Alexa 488 (1:1000; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) and the sections were counterstained with DAPI (100 ng/ml).

The immunohistochemical studies were performed in three to five animals of each experimental condition. It was previously estimated, in test experiments using five animals, that a minimum sample size of three animals would be required to have homogeneous variance and achieve statistical significance. All samples from the same experiment were processed simultaneously, thus minimizing staining variations within groups. The quantification was performed by an experimenter blind to the code. A modified version of the fractionator principle⁴² was followed. The immunopositive cells were counted on six sections per animal that were systematically sampled in the dorsal extent of the DG (at -2.5 to -4.5 from bregma). The whole cross-sectional area on each section was studied, as was the whole section depth. In order to avoid bias due to overcounting, the labeled cells in the uppermost focal plane (at $\times 40$ magnification) were excluded. Positive cells were considered to be in the SGZ when they were directly touching the SGZ or less than two cell bodies away. A

proliferative cluster was defined as any two or more labeled nuclei within 25 μ m of each other. The total number of immunopositive cells and clusters per SGZ was estimated by multiplying by 6 the number of positive cells or clusters in each section. Counts were performed directly from an optical microscope (Nikon Elite, Nikon Corp., Tokyo, Japan) and a confocal fluorescence microscope (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) for a better discrimination of cells within the clusters. The anatomy of the SGZ was analyzed by Nissl staining in parallel series. For the identification of brain structures, the atlas of Paxinos and Watson was followed.⁴³

Dentate gyrus volumetric analysis

DG volumes were measured in the same sections used for BrdU quantifications (counterstained for DAPI). We used a fluorescent motorized Olympus microscope with a digital camera and specific software for the Cavalieri method (CAST, Olympus Corp., Tokyo, Japan). The final data were obtained by unbiased stereological methods.⁴⁴

Electron microscopy analysis

Rats were perfused with 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1 M PB pH 7.4, postfixed for 24 h, and washed several times in 0.1 M PB. The brains were sectioned on a vibratome. They were then postfixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M PB for 90 min in darkness, dehydrated in ethanol, and embedded in araldite (Durcupan; Fluka). Semithin sections (1.5 μ m) were cut with a diamond knife and stained with 1% toluidine blue. Ultrathin (0.05 nm) sections were cut with a diamond knife, stained with lead citrate, and examined under a transmission electron microscope (JEOL-JEM1010 Peabody, MA, USA). Three animals of each condition were analyzed.

Porsolt swimming test or forced swimming test

We employed a previously described protocol⁴⁵ with slight modifications. In a first experiment, we analyzed the behavior of P120E ($n=8$), P120H ($n=9$) and P120R ($n=9$) rats, and we performed a second study using P120E ($n=11$), P120H ($n=6$), P120I ($n=8$), and P120W ($n=7$) rats. Animals were individually trained for 10 min in a Plexiglas cylinder (60 cm height \times 25 cm diameter) filled with tap water (23–25°C) up to a depth of 45 cm, so that the rat's hind limbs could not reach the tank's floor. After training, animals were removed and dried before returning them to their home cages. This forced swim is a mild stress. After 24 h, rats were placed back in the cylinder for a 5-min swim test. Rat behavior was recorded with a video camera located 80 cm above the cylinder and swimming and floating times were scored by an observer blind to rat's thyroidal status. Swimming was defined by escape behaviors, that is, diving, rigorous paddling with all four legs, circling the tank, and clambering at the walls. Immobility was scored as floating and treading water just enough to

keep the nose above water. The immobility in this test is considered as a model of behavioral response to an inescapable stress. The tank was kept as clean as possible by changing the water following two 10-min or four 5-min sessions and removing feces after each session.

Object recognition task

This task, originally developed by Ennaceur and Delacour,⁴⁶ is based on the tendency of rodents to explore a novel object more than a familiar one. P120E ($n=8$), P120H ($n=9$), and P120R animals ($n=9$) were used. Rats were individually habituated to an open field box (in cm, 62 wide \times 50 deep \times 60 high) with sawdust covering the floor, for two consecutive days. The experimenter scoring rat behavior was blind to treatment. During training sessions, two objects were positioned in two adjacent corners, 10 cm from the walls, and each animal was allowed to explore for 5 min. The times spent exploring each object were hand scored using stop-watches. At 24 h after the last training, one object was replaced by a novel one and again the exploratory behavior was analyzed during 5 min. After each session, the objects were cleaned thoroughly with 0.1% acetic acid to eliminate odor cues, the feces were removed, and the sawdust on the floor was stirred after every phase to prevent specific odor from remaining in a specific location. Novel and familiar objects location was counterbalanced across animals during the training and test sessions to reduce potential biases owing to preference for particular locations or objects. Exploration of an object was defined as rearing on the object as well as sniffing it at a distance of less than 2 cm and/or touching it with the nose. Successful recognition of the previously explored sample object is reflected by preferential exploration of the novel object.⁴⁶ To analyze cognitive performance, a discrimination index was calculated as the ratio of the difference in time exploring the novel and familiar object and the total time spent exploring both objects, which made it possible to adjust for any differences in total exploration time.

Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm s.e.m. Significance of results was accepted at $P \leq 0.05$. Statistical comparisons between groups and ages were performed using SPSS statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The Student's *t*-test was used for two-group comparisons. For three-group comparisons when one-way ANOVA indicated a significant effect for group, *post hoc* Tukey's or DMS tests were used, when appropriate. To analyze the distribution of the number of cells per proliferative cluster and the different categories of clusters (two-cell clusters, three-cell clusters, and so on), contingency tables and nonparametric χ^2 asymptotic tests were used, respectively.

Results

Neurogenesis in the adult DG is influenced by thyroid hormone status

The number of proliferating cells in the DG was assessed by BrdU and Ki67 immunohistochemistry.^{34,47}

As previously described,¹⁰ more than 90% of cells labeled with BrdU or Ki67 antibodies were found tightly associated in discrete clusters along the SGZ with a small proportion present as isolated cells. Few labeled cells were located in the granular and molecular layers (data not shown). TH deficiency for 20 days, that is, the P95H group, induced a significant reduction of around 30% in the total number of cells labeled with either antibody (Figure 1a). The number of proliferative clusters was slightly lower in H rats, reaching statistical significance for the clusters identified by the Ki67 antibody (Figure 1b). A similar reduction in the number of proliferating cells was observed in the P120H group (Figure 1c) with a significant reduction in the number of clusters detected with either antibody (Figure 1d). The number of cells per cluster was independent of the thyroidal status. Of major importance is the fact that replacement treatment with TH, that is, the P120R group, resulted in a statistically significant increase in both the total number of proliferating cells and proliferative clusters, in some cases even above the levels of euthyroid control animals (Figure 1c and d).

To determine whether the generation and maturation of the newly born neuroblasts and immature neurons were also affected by adult hypothyroidism,

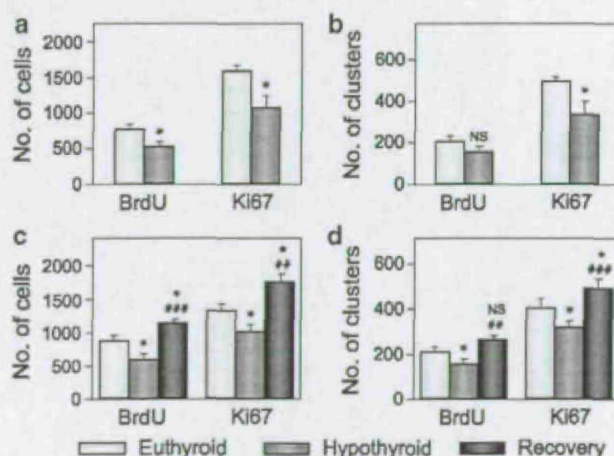


Figure 1 Proliferation analysis of the SGZ at P95 (a–b) and P120 (c–d). Histograms show the total number of proliferating cells (a, c) and proliferative clusters (b, d) measured as BrdU- and Ki67-labeled cells in the SGZ of the DG in euthyroid, hypothyroid, and recovery groups. Hypothyroidism induced a reduction in the number of proliferating cells and clusters, which can be reverted by TH replacement. Plot bars show means \pm s.e.m. Significant differences as compared to the E group are shown as * $P < 0.05$ and as compared to the H group are shown as ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

we studied the number, distribution, and morphology of cells expressing DCX. This cytoskeletal protein is present in cytoplasm, neurites, and growth cones of neuroblasts and young neurons in the adult neurogenic regions.^{11,48}

In P95E rats, the DCX-immunopositive (+) cells were aligned along the dorsal and ventral blades of the SGZ (Figure 2b). In general, DCX+ cells had well developed apical dendrites, in many cases running from the soma to the lateral ventricle. The majority of DCX+ cells had dendrites oriented vertically to the molecular layer and only some of them had dendrites running longitudinally (Figure 2c). Hypothyroidism greatly altered the population of DCX+ cells. Quantitative analysis of the total number of DCX+ cells showed a 35% reduction in P95H rats (Figure 2a) clearly visible in panoramic views of the DG (Figure 2d). In hypothyroid rats, DCX+ cells were not well aligned in the SGZ. Moreover, the dendritic trees of DCX+ cells were highly altered in P95H rats (Figure 2e). The majority of the DCX+ cells in H rats had a hypoplastic dendritic shaft with thinner and shorter dendrites, many of them running with random trajectories that were not vertical to the molecular layer.

Adult-onset hypothyroidism for 45 days also induced a reduction in the number of newly generated cells (25% of DCX; Figure 2f, g and i) in the SGZ of P120H rats as compared to euthyroid animals. The maturation of newly generated cells was also impaired in P120H rats. DCX+ cells showed a highly hypoplastic dendritic shaft (Figure 2h and j), as described above for P95H rats.

The reduced number of DCX+ cells in hypothyroid rats was increased by TH replacement even above the level of euthyroid animals (Figure 2f). TH treatment also improved the dendritic tree morphology, as R rats showed a well-developed dendritic tree with abundant ramifications, which were almost comparable to those of euthyroid animals (Figure 2h, j and l).

Since a decrease in DG neurogenesis with age has been previously described,³⁴ we also analyzed the proliferating and newly generated cells at P120 compared to P95 in euthyroid and hypothyroid rats; we did not find a reduction with age in any of the quantified BrdU, Ki67, or DCX+ cells. Probably this is because of the short period of time between the two ages studied.

Despite the impairment of adult neurogenesis in the SGZ induced by TH deficiency, our analysis of Nissl-stained and semithin sections did not show any gross abnormalities in the anatomy of the DG of H rats and, as stated above, there were no alterations in the volume of granular layer. Electron microscopy and semithin sections did not show increases in pyknotic cells in the TH-deficient groups. TUNEL staining and cleaved caspase-3 immunohistochemistry confirmed these results ($P=0.09$ and $P=0.156$, respectively). In addition, we did not find obvious ultrastructural alterations in hypothyroid animals' granular neurons, except for the presence of nuclear invaginations of

unclear significance. Having studied ca. 400 samples of nuclear profiles of P95 and P120 rats, we found an increase in the number of invaginated nuclei after 45 days of hypothyroidism (P120H rats). Nuclear invaginations were found in about 50% of cells of the granular layer of P120H rats, while the percentage in P120E and P95 rats was only 10–15% (see Supplementary Figure 2). More extensive studies, out of the scope of the present work, would be required to elucidate the meaning of these structural alterations.

Forced swimming test in animals with different thyroid hormone status

An association between changes in the SGZ proliferative capacity and a tendency towards depressive-like behavior has recently been suggested by several groups.^{4,5,49} Since depressive disorders are often manifestations of adult hypothyroidism, we carried out the Porsolt or forced swimming test in P120 E, H, and R rats. In this paradigm, rats forced to swim in a situation from which they cannot escape, rapidly become immobile, floating in an upright position and making only small movements to keep their heads above the water. Depression-like behavior was inferred from increases in the time spent immobile during the test.⁴⁵

During the training session, all groups showed a similar flotation time ($F_{2,21}=2.061$; $P=0.153$) discarding any possible starting reactivity differences between groups (Figure 3a). One-way ANOVA for floating behavior during the Porsolt test indicated a significant effect for group type ($F_{2,21}=25.881$; $P<0.001$). *Post hoc* analyses indicated that hypothyroidism significantly increased the duration of immobility in rats (P120E=117.6 s; P120H=188.7 s; $P<0.001$; Figure 3a), an effect that was reversed by the hormonal treatment (P120R=138.5 s, $P<0.001$ versus H rats; $P=0.112$ versus E rats; Figure 3a).

Cell proliferation and behavior were studied in the same animals. Therefore, we could correlate both sets of data to evaluate a possible relationship between them. The comparison between flotation time during the test session and the number of BrdU+ cells in rats with different thyroidal statuses displayed an inverse relation between both phenomena (Figure 3b).

We also determined the levels of serum corticosterone in animals with different TH statuses at P120. Hypothyroidism significantly reduced and hormonal treatment increased serum corticosterone levels as compared with euthyroid levels (P120E=406±60; P120H=219±50, $P<0.05$ versus E rats; P120R=606±27, $P<0.01$ versus H rats; $P<0.05$ versus E rats).

To evaluate the possibility that TH may acutely affect the depressive-like behavior through direct pathways not related to neurogenesis, we studied the effects of acutely administered TH on behavior.

To this goal, additional forced swimming tests were performed using P120E, P120H, and two groups of TH-treated animals receiving: (i) a single injection of TH immediately after training and 24 h before the test (P120I), or (ii) TH replacement in the drinking water

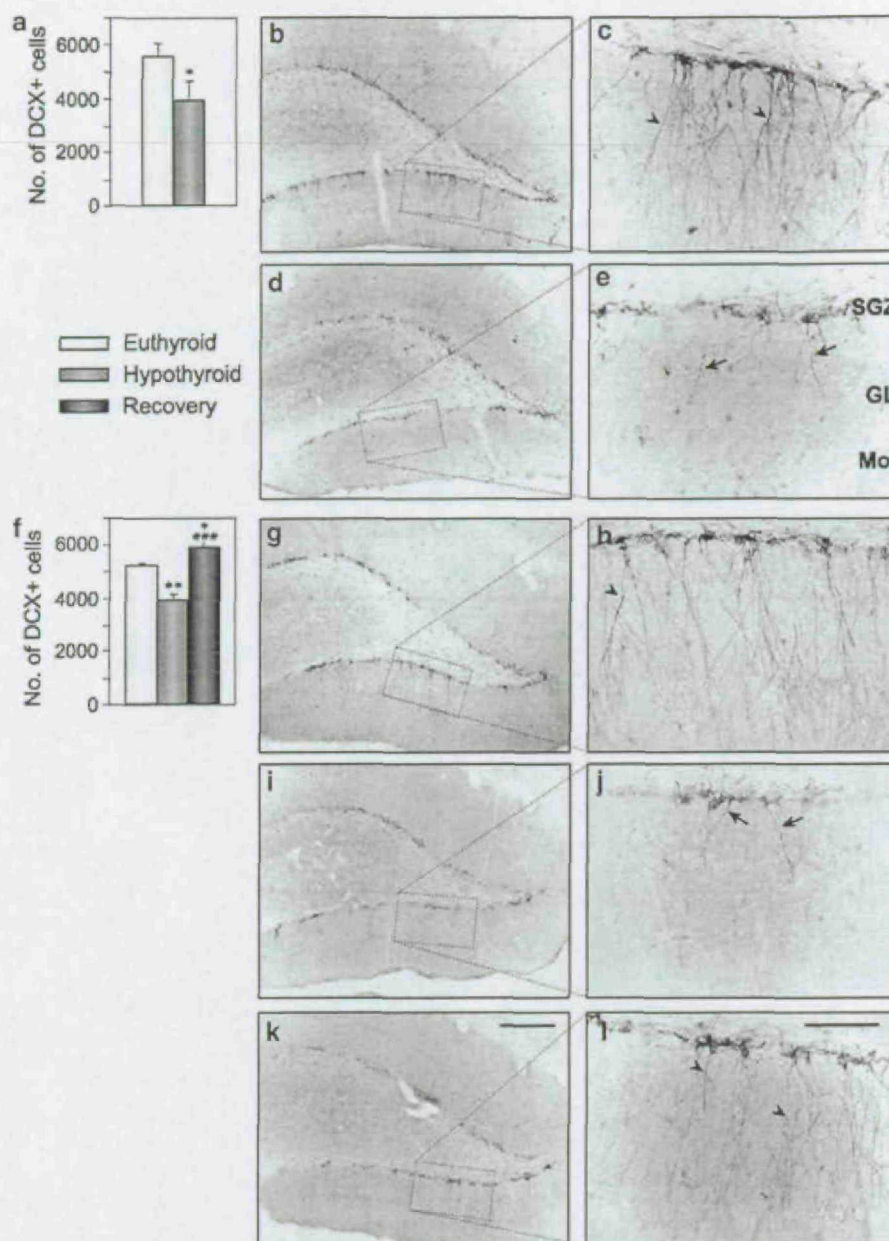


Figure 2 Analysis of the generation and maturation of neuroblasts in the SGZ of P95 (a–e) and P120 (f–l) animals. (a) and (f) show histograms with the total number of DCX + cells of P95 and P120 rats, respectively, in euthyroid, hypothyroid, and recovery groups. (b–e) and (g–l) show panoramic views and insets of DCX immunohistochemistry in P95E (b–c), P95H (d–e), P120E (g–h), P120H (i–j), and P120R (k–l) animals. Remarkable lower number of labeled cells with a poorly developed dendritic shaft with fewer, shorter, and less ramifications was found in hypothyroid groups (arrows) as compared with the dendritic shafts in euthyroid and recovery groups (arrowheads). Plot bars show means \pm s.e.m. Significant differences as compared with the E group are shown as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and as compared with H group is shown as *** $P < 0.001$. Scale bars, 250 μ m in panoramic views and 50 μ m in insets. SGZ, subgranular zone. GL, granular layer. Mol, molecular layer.

starting 48 h before the test session (P120W; see Materials and methods for details). Again no differences were found between any of the experimental groups during the training session ($F_{2,21} = 0.774$, $P = 0.518$; Figure 4). The results of this experiment showed that both P120I and P120W, short-term treated rats, behave similarly to P120H animals showing no differences in flotation time (P120E = 123.0 ± 8.5 ; P120H = 166.8 ± 10.8 ; P120I =

172.5 ± 16.8 ; P120W = 165.0 ± 6.8 ; in all groups, $P < 0.05$ versus E). These results further strengthen the relation between neurogenesis and behavior.

Preserved memory in the novel object recognition task after short-term hypothyroidism

To evaluate whether the decrease in hippocampal neurogenesis may compromise hippocampus-dependent memory, we used the novel object recognition

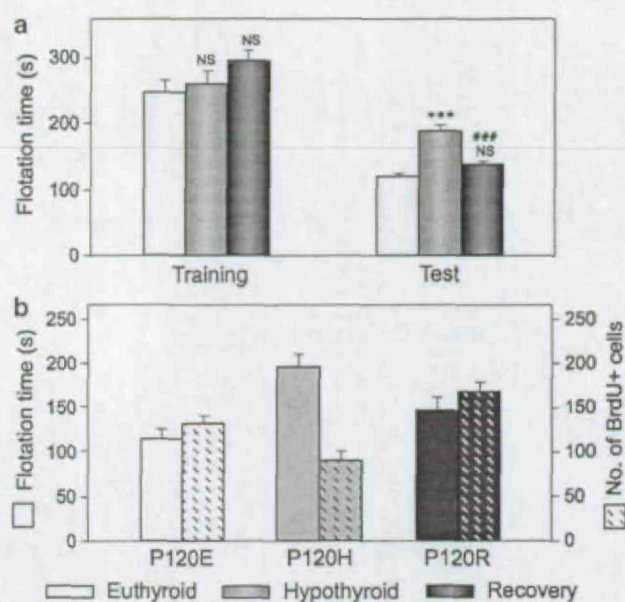


Figure 3 Behavior of euthyroid, hypothyroid, and recovery groups in the forced swimming test. (a) All the experimental groups presented similar flotation time in the training session. However, in the forced swimming test performed 24 h after training, there was an increase in the flotation time in H animals, which was recovered after chronic TH replacement. (b) Comparison between the flotation time during the test session and the number of proliferating cells (BrdU+) analyzed in the same animals. There is an inverse relationship between both sets of data. Plot bars show means \pm s.e.m. Significant differences as compared with the E group are shown as *** $P < 0.001$ and as compared with the H group are shown as **** $P < 0.001$.

task,⁴⁶ a test that measures visual recognition memory, a form of declarative memory.⁵⁰ We used two different objects during the sample phase, and a long retention delay, a procedure that most probably would increase the demand of the hippocampus.⁵¹

During training, none of the groups showed preference for any of the initial objects, that is, the three groups explored both initial objects during a similar period of time ($F_{2,21} = 0.17$; $P = 0.85$; Figure 5), and there was no locomotive or exploratory impairment in hypothyroid rats (data not shown). At the retention test 1 day later, E, H, and R rats exhibited a strong preference towards exploring the novel object, as indicated by a discrimination index significantly different from chance level (50%) (P120E = 65.3%, $t_7 = 10.1$, $P < 0.001$; P120H = 67.3%, $t_6 = 7.02$, $P < 0.001$; P120R = 61.8%, $t_8 = 2.2$, $P < 0.05$; Figure 5), but no intergroup differences were found ($F_{2,21} = 0.52$; $P = 0.60$; Figure 5). These findings indicate that the three groups of rats did express retention of the familiar object. Thus, the impairment in hippocampal neurogenesis induced by adult-onset hypothyroidism of this short duration does not alter visual recognition memory on this task.

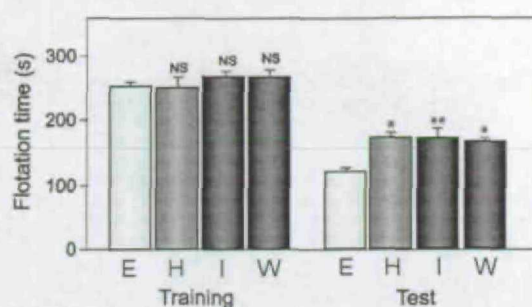


Figure 4 Behavior of euthyroid (E), hypothyroid (H) and acute TH-treated animals (I and W) in the forced swimming test. The increase in the flotation time in H animals was not recovered after two different acute TH administration protocols. Plot bars show means \pm s.e.m. Significant differences as compared with the E group are shown as * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

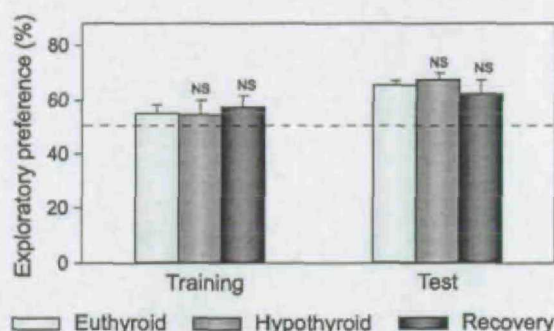


Figure 5 Behavior of euthyroid, hypothyroid, and recovery groups in the object recognition task. No differences in exploratory preference were found between groups neither in the training nor in the test session. Plot bars show means \pm s.e.m. The dashed line represents equal exploration of the novel and familiar objects (50%).

Discussion

The most relevant finding of this work is that TH are needed for the proper acquisition of new granular neurons at adult stages. Our *in vivo* studies clearly show that adult-onset hypothyroidism, even for a short period of time, impairs hippocampal proliferative capacity and suggest a relationship with a depressive-like behavior. The fact that TH replacement reverses the changes in cellular proliferation and maturation in the SGZ, and the abnormal behavior in the same animals and for the same period of time strongly supports this relation.

To measure cell proliferation in the SGZ, we used two markers, with good agreement between them. BrdU is incorporated during the S-phase of the cell cycle, which in proliferating cells of the SGZ lasts around 8 h, and the entire cell cycle 25 h.⁵² Using this protocol, BrdU+ cells would therefore represent cells that had entered S-phase and will still be cycling within the 24-h period between the first BrdU injection and the killing of the animals. Only a small proportion of postmitotic cells would also be labeled.

This agrees with the finding of more than 90% of the labeled cells in proliferative clusters, and the similarity in the distribution of cells expressing Ki67, which labels proliferating cells in any phase of the cell cycle.⁴⁷ Adult-onset hypothyroidism induced a reduction in the number of proliferating cells and proliferative clusters in the SGZ as soon as 20 days after thyroidectomy, the first period studied, and also 1 month later. We observed the same reduction in newborn neuroblasts. The results indicate that proliferation in the SGZ is very sensitive to TH. The agreement between the BrdU and Ki67 data indicate that the reduction in BrdU+ cells in H rats was not because of restriction of BrdU transfer across the blood-brain barrier. Other *in vivo* studies show that TH could reverse impaired hippocampal neurogenesis during development⁵³ and in the adult SVZ.²⁶ Lemkine *et al.*²⁶ found that TH influence precursor cell proliferation in the SVZ, using Ki67 and phosphorylated histone H3 as proliferation markers. The effect was not observed when BrdU incorporation was used, which led the authors to propose that hypothyroidism increased the number of progenitors in the resting state in the SVZ. Uchida *et al.*⁵³ also found that TH increased cell proliferation in the hippocampus of hypothyroid mice. In contrast, Desouza *et al.*²⁷ and Ambrogini *et al.*²⁸ found no effect of TH on cell proliferation as measured by BrdU incorporation. The reasons for these discrepancies are not apparent to us, but may reside in different BrdU uptake protocols or to the use of goitrogens to induce hypothyroidism.

TH treatment of hypothyroid rats increased the number of proliferating cells and proliferative clusters, even above euthyroid values. This suggests a compensatory mechanism of prompt recovery of normal neurogenesis after damage. To our knowledge, this is the first description of variations in the number of proliferative clusters in the SGZ owing to a modulatory neurogenesis mechanism. A compensatory burst in cell proliferation also occurs after alcohol abstinence.⁵⁴ In addition, the damaged SVZ subsequent to antimitotic exposure is capable of completely regenerating itself from stem cells after 10 days of antimitotic withdrawal.⁵⁵ It is possible that cell proliferation in the SGZ of hypothyroid animals becomes more sensitive to TH treatment, so that even slightly increased TH levels in the treated animals could result in a significant upregulation of proliferation.

In the SGZ, the majority of the proliferating cells will differentiate into neurons.⁵⁶ Therefore, the observed reduction in proliferating cells after TH withdrawal would be expected to result in a lower number of committed newborn neuroblasts. This was confirmed with the analysis of DCX+ cells, which showed that the population of early generated neuroblasts and immature neurons was reduced in hypothyroid animals and these cells were, in addition, severely damaged. The effect of TH deficiency on the DCX population most probably reflects an

impaired generation of neuronal progenitors since it was similar to that on proliferation, whether hormone insufficiency was maintained for 20 or 45 days. In contrast to other studies,^{27,28} we did not observe changes in cell survival in the different experimental situations, as assessed by three different methods: number of pyknotic nuclei, TUNEL staining, and cleaved caspase-3-immunopositive cells. Therefore, selective apoptosis can be discarded in our studies. In addition to increasing precursor cell proliferation, TH replacement also induced an increase in the number of DCX+ cells above euthyroid levels.

TH treatment also influenced the maturation of newly generated cells altering their neurite outgrowth. In euthyroid animals, the dendrites of DCX+ cells reached the molecular layer, and even crossed this layer into the ventricular zone. The functional significance of these long dendrites is unknown but could be relevant for terminal differentiation and functional integration, similar to the requirement of new neurons to extend dendrites and axons to form synapses during development.⁴⁸ DCX expression could be related to microtubule reorganization and cellular processes outgrowth. The effect of TH on neurite extension in the SGZ agrees with previous findings on the role of TH on cytoskeletal assembly and stability.⁵⁷ Other studies indicate that adult-onset hypothyroidism decreases neurite extension and spines of neocortical neurons that is partially reverted after 25 days of T4 treatment.⁵⁸ The recovery in the number and neurite outgrowth of DCX+ cells could be due to the addition of newly generated cells or to an improvement of the dendritic shaft of damaged cells. We think that probably both processes could be implicated, based in the increase in cellular proliferation shown here and in classical studies on the effects of TH on dendritic development in the adult.⁵⁸ The fact that TH replacement is not only capable of promoting cellular proliferation but also differentiation of newborn neuroblasts indicates that TH may well be important factors for the induction of neuronal turnover.

We examined the possibility that short-term hypothyroidism could influence neurogenesis by affecting circulating levels of glucocorticoids, stress-related hormones that have been consistently found to affect the number of newborn cells in the DG.^{59,60} Plasma corticosterone was lower in hypothyroid rats than in euthyroid and TH-treated rats, in agreement with previous studies.⁶¹ Since high levels of glucocorticoids inhibit neurogenesis, it is unlikely that the effects of TH are exerted by changes in corticosterone levels. Moreover, this relationship between thyroidal status and corticosterone levels also discards the possibility that the increased floating behavior observed in hypothyroid rats could have been induced by differences in adrenal function, since low levels of glucocorticoids are associated with reduced immobility in the forced swimming test and *vice versa*.⁶²

In parallel to recovering the impaired progenitor cells' proliferation, TH replacement also induced a

behavioral response as in other situations of adult hippocampal proliferation activation.^{4,5,49} The results indicate that adult-onset hypothyroidism induces a selective, reversible behavioral alteration characterized as a depressive-like state. Although depression should be considered within the general context of structural plasticity, accumulating experimental evidence indicates that psychiatric disturbances, including dementias and major depression, are closely related to neurogenesis in the adult DG. Thus, chronic antidepressant treatment increases proliferation in the DG³⁵ and the efficacy of antidepressant treatment depends on stimulation of precursor proliferation in the hippocampus.⁴ Therefore, we studied the relation between the effects of TH on proliferation with behavior. Using the forced swimming test, which is the best characterized and most widely used test for assessing alterations in depressive-like behavior in rodents,^{63,64} we found that hypothyroid rats displayed a depressive-like behavior as compared to euthyroid animals. In a previous study,⁶⁵ severe hypothyroidism was also found to increase immobility in the forced swimming paradigm compared to euthyroid rats, an effect that was prevented by high doses of T4. In other studies, rat strain differences in thyroidal status seem to explain different behavior in the forced swimming test,⁶⁶ and TH treatment ameliorates the cognitive and mood impairments caused by alcohol exposure.⁶⁷ In our present study, chronic TH treatment restored the depressive-like behavior in parallel with normalization of proliferation in the hippocampus. The fact that acute TH administration, during a time likely not to have an effect on neurogenesis, failed to normalize behavior, further strengthen the relation between neurogenesis and behavior after chronic TH treatment. In humans, alterations of thyroid function are associated with psychiatric disturbances, especially depressed mood, reversible with substitution therapy.^{2,68} TH treatment is also beneficial in bipolar disorders resistant to other forms of treatment.^{69,70}

Concerning cognitive functioning, there was no difference among the experimental groups in the long-term object recognition memory. A recent study⁷¹ found that treatment with the antimitotic agent methylazoxymethanol acetate reduces neurogenesis in the hippocampus up to 65% and prevents the long-term memory improvement induced by environmental enrichment, as measured in this object recognition task. Therefore, it seems reasonable to speculate that new granule neurons do participate in this type of memory. In our study, however, adult-onset hypothyroidism reduced neurogenesis around 30% in the DG, an effect that may not be enough to significantly affect long-term recognition memory. Future experiments will be performed in order to address this issue.

In conclusion, our results indicate that TH markedly influence adult hippocampal neurogenesis, underlying the role of a proper TH status in hippocampal function. In humans, mood disorders

due to adult hypothyroidism could be related, at least in part, to the impairment of neurogenesis. We do not know whether this could lead to permanent damage but, among its possible clinical implications, our observations should be taken into account in the evaluation of clinical protocols that include TH withdrawal, periodically for several weeks, in patient preparation for ¹³¹I-scanning after thyroidectomy.

Acknowledgments

We thank Marina Sanz Sancristóbal, Mario Soriano, and Ana Isabel Herrero for their excellent technical help, Carmina Criado for providing facilities to perform the behavioral studies, Laura Barrios for her assistance with the statistical analyses and Javier Perez for the art work. We also thank Gabriela Morreale de Escobar and Francisco Escobar del Rey for helpful discussions and advise in the experimental animal design. This work was supported by Grants BFI2001-2412 and BFU2004-05944 (AG-F), BFI2002-00489 (JB), BFI2003-07524 (CV) from the Ministry of Science and Technology and FIS, Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros RCMN (C03/08). AM-P and IF-L are the recipients of a fellowship and AG-F and CV of a contract from the Ramón y Cajal Program, all of the Ministry of Science and Technology, Spain.

References

- Vanderpump MP, Tunbridge WM. Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 2002; **12**: 839–847.
- Joffe RT. Hypothalamic–pituitary–thyroid axis. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R (eds). *Hormones, Brain, and Behavior*. Academic Press: San Diego, 2002, pp 867–881.
- Bauer M, Whybrow P. Thyroid hormone, Brain, and Behavior. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R (eds) *Hormones, Brain, and Behavior*. Academic Press: San Diego, 2002, pp 239–264.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 2003; **301**: 805–809.
- Malberg JE, Duman RS. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 2003; **28**: 1562–1571.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; **4**: 1313–1317.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 2002; **22**: 629–634.
- Gage FH. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 2002; **22**: 612–613.
- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 2002; **22**: 619–623.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 2000; **425**: 479–494.
- Nacher J, Crespo C, McEwen BS. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci* 2001; **14**: 629–644.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002; **415**: 1030–1034.
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2004; **14**: 186–191.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 2002; **12**: 578–584.

- 15 Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 1999; **2**: 260–265.
- 16 Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 2001; **437**: 496–504.
- 17 Keilhoff G, Becker A, Grecksch G, Bernstein HG, Wolf G. Cell proliferation is influenced by bulbectomy and normalized by imipramine treatment in a region-specific manner. *Neuropsychopharmacology* 2005, Epub ahead of print.
- 18 Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2001; **21**: 1628–1634.
- 19 Bernal J. Thyroid hormones and Brain Development. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R (eds). *Hormones, Brain, and Behavior*. Academic Press: San Diego, 2002, pp 543–587.
- 20 Legrand J. Effects of thyroid hormones on central nervous system. In: Yanai J (ed). *Neurobehavioral Teratology*. Elsevier: Amsterdam, 1984, pp 331–363.
- 21 Martinez-Galan JR, Pedraza P, Santacana M, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G, Ruiz-Marcos A. Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2701–2709.
- 22 Madeira MD, Cadete-Leite A, Andrade JP, Paula-Barbosa MM. Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adult rats: a morphometric study. *J Comp Neurol* 1991; **314**: 171–186.
- 23 Guadano-Ferraz A, Benavides-Piccione R, Venero C, Lancha C, Vennstrom B, Sandi C et al. Lack of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry* 2003; **8**: 30–38.
- 24 Venero C, Guadano-Ferraz A, Herrero AI, Nordstrom K, Manzano J, de Escobar GM et al. Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor $\alpha 1$ can be ameliorated by T3 treatment. *Genes Dev* 2005; **19**: 2152–2163.
- 25 Fernandez M, Pirondi S, Manservigi M, Giardino L, Calza L. Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat. *Eur J Neurosci* 2004; **20**: 2059–2070.
- 26 Lemkine GF, Raji A, Alfama G, Turque N, Hassani Z, Alegria-Prevot O et al. Adult neural stem cell cycling *in vivo* requires thyroid hormone and its α receptor. *FASEB J* 2005; **19**: 863–865.
- 27 Desouza LA, Ladiwala U, Daniel SM, Agashe S, Vaidya RA, Vaidya VA. Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 2005; **29**: 414–426.
- 28 Ambrogini P, Cuppini R, Ferri P, Mancini C, Ciaroni S, Voci A et al. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology* 2005; **81**: 244–253.
- 29 Iniguez MA, Rodriguez-Pena A, Ibarrola N, Morreale de Escobar G, Bernal J. Adult rat brain is sensitive to thyroid hormone. Regulation of RC3/neurogranin mRNA. *J Clin Invest* 1992; **90**: 554–558.
- 30 Berbel P, Guadano-Ferraz A, Martinez M, Quiles JA, Balboa R, Innocenti GM. Organization of auditory callosal connections in hypothyroid adult rats. *Eur J Neurosci* 1993; **5**: 1465–1478.
- 31 Zarrow MX, Yochim JM, McCarthy JL. *Experimental Endocrinology: A Sourcebook of Basic Techniques*. London: Academic Press, Inc., 1964.
- 32 Zavacki AM, Ying H, Christoffolete MA, Aerts G, So E, Harney JW et al. Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. *Endocrinology* 2005; **146**: 1568–1575.
- 33 Escobar-Morreale HF, del Rey FE, Obregon MJ, de Escobar GM. Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. *Endocrinology* 1996; **137**: 2490–2502.
- 34 Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996; **16**: 2027–2033.
- 35 Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; **20**: 9104–9110.
- 36 Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 2002; **36**: 1021–1034.
- 37 Reif A, Schmitt A, Fritzen S, Chourbaji S, Bartsch C, Urani A et al. Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour. *Eur J Neurosci* 2004; **20**: 885–895.
- 38 Pham K, McEwen BS, Ledoux JE, Nader K. Fear learning transiently impairs hippocampal cell proliferation. *Neuroscience* 2005; **130**: 17–24.
- 39 Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 1985; **117**: 1890–1900.
- 40 Rao MS, Shetty AK. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 2004; **19**: 234–246.
- 41 Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2005; **21**: 1–14.
- 42 Williams RW, Rakic P. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 1988; **278**: 344–352.
- 43 Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press Inc, 1986.
- 44 Sousa N, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study. *Brain Res* 1998; **794**: 199–210.
- 45 Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977; **266**: 730–732.
- 46 Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988; **31**: 47–59.
- 47 Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 2002; **115**: 97–105.
- 48 Ribak CE, Korn MJ, Shan Z, Obenaus A. Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. *Brain Res* 2004; **1000**: 195–199.
- 49 Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G et al. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 2005; **115**: 3104–3116.
- 50 Myhrer T. The role of medial and lateral hippocampal perforant path lesions and object distinctiveness in rats' reaction to novelty. *Physiol Behav* 1988; **42**: 371–377.
- 51 Vnek N, Rothblat LA. The hippocampus and long-term object memory in the rat. *J Neurosci* 1996; **16**: 2780–2787.
- 52 Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2001; **435**: 406–417.
- 53 Uchida K, Yonezawa M, Nakamura S, Kobayashi T, Machida T. Impaired neurogenesis in the growth-retarded mouse is reversed by T3 treatment. *NeuroReport* 2005; **16**: 103–106.
- 54 Nixon K, Crews FT. Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *J Neurosci* 2004; **24**: 9714–9722.
- 55 Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11619–11624.
- 56 Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 2004; **46**: 41–52.

- 57 Nunez J, Couchie D, Aniello F, Bridoux AM. Regulation by thyroid hormone of microtubule assembly and neuronal differentiation. *Neurochem Res* 1991; **16**: 975–982.
- 58 Ruiz-Marcos A, Sanchez-Toscano F, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Reversible morphological alterations of cortical neurons in juvenile and adult hypothyroidism in the rat. *Brain Res* 1980; **185**: 91–102.
- 59 Cameron HA, Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 1994; **61**: 203–209.
- 60 Karishma KK, Herbert J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur J Neurosci* 2002; **16**: 445–453.
- 61 Kamilaris TC, DeBold CR, Johnson EO, Mamalaki E, Listwak SJ, Calogero AE et al. Effects of short and long duration hypothyroidism and hyperthyroidism on the plasma adrenocorticotropin and corticosterone responses to ovine corticotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 1991; **128**: 2567–2576.
- 62 Baez M, Volosin M. Corticosterone influences forced swim-induced immobility. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; **49**: 729–736.
- 63 Porsolt R, Lenegre A, McArthur R. Pharmacological models of depression. In: Olivier B, Mos J, Slangen JL (eds). *Animal Models in Psychopharmacology*. Birkhauser: Basel, 1991, pp 137–159.
- 64 Redei EE, Ahmadiyeh N, Baum AE, Sasso DA, Slone JL, Solberg LC et al. Novel animal models of affective disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 2001; **6**: 43–67.
- 65 Kulikov A, Torresani J, Jeanningros R. Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. *Neurosci Lett* 1997; **234**: 111–114.
- 66 Redei EE, Solberg LC, Kluczynski JM, Pare WP. Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. *Neuropsychopharmacology* 2001; **24**: 632–639.
- 67 Wilcoxon JS, Kuo AG, Disterhoft JF, Redei EE. Behavioral deficits associated with fetal alcohol exposure are reversed by prenatal thyroid hormone treatment: a role for maternal thyroid hormone deficiency in FAE. *Mol Psychiatry* 2005; **10**: 961–971.
- 68 Oomen HA, Schipperijn AJ, Drexhage HA. The prevalence of affective disorder and in particular of a rapid cycling of bipolar disorder in patients with abnormal thyroid function tests. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; **45**: 215–223.
- 69 Bauer M, London ED, Rasgon N, Berman SM, Frye MA, Altshuler LL et al. Supraphysiological doses of levothyroxine alter regional cerebral metabolism and improve mood in bipolar depression. *Mol Psychiatry* 2005; **10**: 456–469.
- 70 Baumgartner A, Bauer M, Hellweg R. Treatment of intractable non-rapid cycling bipolar affective disorder with high-dose thyroxine: an open clinical trial. *Neuropsychopharmacology* 1994; **10**: 183–189.
- 71 Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 2005; **21**: 513–521.

Supplementary information accompanies the paper on Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)

ANEXO 2
OTRAS
PUBLICACIONES

Divergent Expression of Type 2 Deiodinase and the Putative Thyroxine-Binding Protein p29, in Rat Brain, Suggests that They Are Functionally Unrelated Proteins

ANA MONTERO-PEDRAZUELA, JUAN BERNAL, AND ANA GUADAÑO-FERRAZ

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols," Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain

Deiodinases (D1, D2, and D3) are selenoproteins involved in thyroid hormone metabolism. Generation of the active hormone T_3 from T_4 is carried out by D1 and D2, whereas D3 degrades both hormones. The identity of the cloned D2 as a selenoprotein is well supported by biochemical and physiological data. However, an alternative view has proposed that type 2 deiodinase is a nonselenoprotein complex containing a putative T_4 binding subunit called p29, with an almost identity in sequence with the Dickkopf protein Dkk3.

To explore a possible functional relationship between p29 and D2, we have compared their mRNA expression patterns in

the rat brain. In brain, parenchyma p29 was expressed in neurons. High expression levels were found in all the regions of the blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier. p29 was present in different types of cells than D2, with the exception of the tanycytes. Our data do not support that p29 has a functional relationship with D2. On the other hand, expression of p29 in the blood-CSF barrier suggests that it might be involved in T_4 transport to and from the CSF, but further studies are needed to substantiate this hypothesis. (*Endocrinology* 144: 1045-1052, 2003)

DEIODINASES ARE A FAMILY of selenoproteins involved in thyroid hormone (TH) metabolism and, specifically, in generation of T_3 from T_4 and degradation of iodothyronines [reviewed by Bianco *et al.*, 2002 (1); Leonard and Köhrle, 2000 (2); Köhrle, 1999 (3); and Leonard and Visser, 1986 (4)]. Three deiodinases have been identified and cloned (5-7) and are known as type 1 (D1), type 2 (D2), and type 3 (D3) deiodinases. Generation of the active hormone T_3 from T_4 in target tissues is performed by D1 and D2. In rodents, D1 and D2 have similar contributions to circulating T_3 . D2 is additionally involved in the intracellular generation of T_3 in target tissues such as brain, pituitary and brown adipose tissue. In humans, D2 is also expressed in skeletal muscle and may also contribute to circulating T_3 (8). Degradation of T_4 and T_3 to reverse T_3 and 3,3'-diiodothyronine, respectively, is carried out by D1 and D3 (9).

Deiodinases are selenoproteins, which contain the rare amino acid selenocysteine. The selenoprotein mRNAs contain a bifunctional UGA codon that signals either the usual stop codon, or the amino acid selenocysteine. For the latter function, it needs Se and a special sequence in the 3'-untranslated region called the selenocysteine insertion sequence element. The selenoprotein nature of D1 and D3 has not been a matter of discussion (7, 10, 11). Concerning D2, the identification of a selenocysteine insertion sequence element in the human D2 (12), robust biochemical data (13), and results from knockout animals (14) solidly support the identity of the cloned D2 as a physiological selenoprotein with D2 activity. Despite this, an alternative view has proposed that D2 is a nonselenoprotein, multiprotein complex of about 200

kDa consisting of catalytic and T_4 -binding subunits (15, 16). Furthermore, the cloned D2 mRNA would not encode the physiological enzyme. Reasons to support these views include a lack of effect of Se deficiency on D2 activity (17-19), the low inhibition of type 2 deiodinase activity by gold in contrast with other selenoproteins (20), and the failure to detect any protein with antibodies generated from the conceptual translation of the cloned D2 cDNA (21). Along this reasoning, a putative T_4 -binding subunit identified by affinity labeling as a 29-kDa protein (p29) was recently cloned from rat (22). The cDNA encoding p29 has a high degree of similarity to members of the Dickkopf (Dkk-1-4) family of secreted glycoproteins involved in regulation of dorsoventral patterning during embryonic development (23, 24). In particular, rat p29 has 87% similarity at the nucleotide level with mouse Dkk-3, a protein with tumor suppressor activity (25) expressed at higher levels in heart, brain and spinal cord (23). Data supporting a role for p29 in TH metabolism include the enhancement of D2 activity when transfected to cultured astrocytes (22).

Expression of D2 is particularly important in the brain given the developmental effects of TH and the fact that most T_3 present in brain is formed locally from T_4 because of D2 activity (26). Expression and activity of D2 in brain are regulated by TH concentrations such that they increase in hypothyroidism and decrease in hyperthyroidism as a compensatory mechanism to maintain normal T_3 concentrations (27-31). D2 is expressed predominantly in astrocytes and, in much higher amounts, in the tanycytes lining the walls of the third ventricle (32, 33). Expression of D2 mRNA correlates with deiodinase activity measured in punches from different brain regions (34). We reasoned that, if there is any functional relationship between p29 as a putative T_4 -binding subunit of

Abbreviations: CSF, Cerebrospinal fluid; D1-D3, deiodinases types 1-3; Dkk, Dickkopf; p29, 29-kDa protein; TH, thyroid hormone; UTP, uridine triphosphate.

a deiodinase multiprotein complex and D2, the expression of both molecular species would show a large degree of overlap among regions and cell types of brain tissue. To this end, we have simultaneously analyzed the distribution of p29 and D2 mRNAs by *in situ* hybridization. Our results indicate that p29 is expressed in different types of cells than D2, with the notable exception of the tanycytes. p29 is expressed with a neuronal-like distribution and is also found in cells of the blood-CSF barrier. Our data do not support that p29 has a functional relationship with D2, but open the possibility that it may be involved in T_4 transport to and from the CSF contributing to T_4 availability within the brain.

Materials and Methods

Animals and treatments

Male Wistar rats 16 and 60 d old (P16 and P60) were used in these studies. In addition, hypothyroid male Wistar P16 rats were used. To induce hypothyroidism, pregnant dams were given 0.02% 2-mercapto-1-methylimidazole (Sigma, St. Louis, MO) and 1% sodium perchlorate in the drinking water *ad libitum* from gestational d 10 and throughout lactation until the neonates were killed at P16. This protocol causes severe hypothyroidism as shown by reduced growth rate and large decreases of T_4 and T_3 concentrations in serum and cerebral cortex (35). Animals were under temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and light (12-h light, 12-h dark cycle; lights on at 0700 h) controlled conditions and had free access to food and water. Animal care procedures were conducted in accordance with the guidelines set by the European Community Council Directives (86/609/EEC).

Tissue processing

Rats were anesthetized by ip injection of a mixture of Ketamine (4 mg/100 g body weight) and Metomidine (15 mg/100 g body weight), and the animals were perfused transcardially with fixative [4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4]. Brains were removed, post fixed in the same solution overnight, and cryoprotected at 4°C for 2–3 d in the paraformaldehyde solution containing 30% sucrose. They were then frozen in dry ice and coronal sections $25\ \mu\text{m}$ thick were obtained in a cryostat. The sections were stored at -70°C in a cryoprotective solution containing 30% ethylenglycol, 30% glycerol, and 40% 0.1 M phosphate buffer.

RNA probes

A specific p29 probe (nucleotides 1172–1499, 327 bp) was designed based on the published rat cDNA sequence (accession no. AF245040) (22), and the DNA template isolated by RT-PCR. Total cerebral cortex RNA was isolated from P16 rats using TRIzol reagent (Life Technologies, Inc.) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was obtained with the cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). The following primers were used to amplify the p29 specific sequences: forward (1172–1191), 5'-CTTGA CAAGG TACAG TGCAG-3'; reverse (1480–1499), 5'-CAGGA GCTAT GCTGC TCTTG-3'. The PCR products were cloned in the pGEM-T easy vector (Promega Corp., Madison, WI). The sense (SP6 RNA polymerase) and antisense (T7 RNA polymerase) riboprobes for *in situ* hybridization were synthesized in the presence of ^{35}S -uridine triphosphate (UTP) (NEN Life Science Products) or digoxigenin-UTP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) by *in vitro* transcription.

In addition to the above probe, two 50-oligonucleotide probes, 1) 5'-GGAGC TAAAA CACTG GGGAC TGGGG GAGTA ATGTG TG-GAA GGCCA CAAGAG-3'; and 2) 5'-CCTGC CACGC CTGTC TTCTT TCCT AAGCC AGAGA AGTGG GGCAG CTGGA-3', from the p29 sequence were used as probes in *in situ* hybridization experiments. The oligonucleotides were labeled with ^{35}S - α -deoxy-ATP (Dupont, Wilmington, DE) and terminal transferase (Roche Molecular Biochemicals).

A specific D2 antisense riboprobe was synthesized with SP6 RNA polymerase in the presence of ^{35}S -UTP (Dupont) using a 366-bp

DNA template spanning nucleotides 535–901 (32) from the rat D2 cDNA sequence (5).

Northern blot analysis

The specificity of the probes was tested by Northern blot analysis with total RNA from cerebellum and cerebral cortex from P16 rats isolated as above. Northern blots were prepared using nylon membranes (Nytran, Schleicher & Schuell, Inc., Keene, NH). Ten micrograms of total RNA were fractionated on formaldehyde-agarose gels and transferred to the filters using standard techniques (36). The cDNA radioactive probes were labeled with the kit rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech) using ^{32}P -deoxy-CTP. The filter was hybridized with the same probe used in the *in situ* hybridization analysis (327-bp probe spanning nucleotides 1172–1499 from the rat p29 cDNA). As control for the amount and integrity of the RNA present on the filters, blots were stained in 0.02% methylene blue solution in 0.3 M sodium acetate and then hybridized with a probe specific for the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

In situ hybridization with radioactive probes

The detection of p29 and D2 mRNAs with ^{35}S -labeled riboprobes was performed on free-floating sections according to protocols previously described in detail (37, 38). Briefly, the sections were pretreated in different solutions for 10 min at room temperature each: permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS, deproteinized with 0.2 N HCl, acetylated with 0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine buffer (pH 8.0), postfixed in fixative, and washed in PBS. Prehybridization was performed at 55°C for 3–5 h, in a solution containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, $5\times$ Denhardt's solution, 0.62 M NaCl, 50 mM DTT, 0.01 M EDTA, 0.02 M 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (pH 6.8), 0.2% sodium dodecyl sulfate, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ salmon sperm DNA, and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yeast tRNA. Hybridization was performed in this solution at 55°C for 16 h, with the ^{35}S -labeled riboprobe at 1.6×10^7 cpm/ml. Excess probe was removed with $2\times$ saline sodium citrate (SSC; $1\times$ SSC is 0.015 M NaCl, 0.0015 M Na citrate) containing 10 mM β -mercaptoethanol at room temperature for 30 min, followed by incubation with 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ribonuclease A in 0.5 M NaCl, 0.05 M EDTA, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) at 37°C for 1 h. Stringency washes were carried out in $0.5\times$ SSC, 50% formamide, 10 mM β -mercaptoethanol at 55°C for 2 h, and then in $0.1\times$ SSC, 10 mM β -mercaptoethanol at 68°C for 1 h.

To detect p29 mRNA with oligonucleotide probes, the free-floating sections were only acetylated, postfixed, and hybridized for 20 h at 42°C with ^{35}S -labeled oligonucleotides at 2×10^6 cpm/ml. Excess probe was removed with $1\times$ SSC. Stringency washes were carried out in $1\times$ SSC at 42°C and $0.1\times$ SSC at room temperature.

In situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry

To analyze the cell types that express p29 mRNA, a combination of *in situ* hybridization histochemistry and immunohistochemistry was performed in the same tissue section, using a double-labeling technique previously described (39). Briefly, after hybridization and washes, the free-floating sections were incubated sequentially with the primary antibody overnight at 4°C , then with a biotinylated secondary antibody (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h at 4°C and finally processed by the avidin-biotin-peroxidase method using the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, PK-6100) with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, D-5905) and H_2O_2 as peroxidase substrates. Omitting the primary antibody resulted in negligible color development. The antibodies used were a polyclonal antibody against glial fibrillary acidic protein (1/2000; Dakopatts, M-0725) to detect astrocytes; a mouse monoclonal antibody antiparvalbumin (1/1000; Sigma, C-8666) and a mouse monoclonal antibody antiparvalbumin (1/4000; Sigma, C-9848) to localize subsets of interneurons.

Double in situ hybridization with riboprobes

For cellular colocalization studies, the free-floating sections were processed as described above but hybridized with both the p29-specific digoxigenin-labeled riboprobe at 200 ng/ml and the D2-specific ^{35}S -

labeled riboprobe at 1.6×10^7 cpm/ml. After several washes with PBS, the sections hybridized with digoxigenin-labeled riboprobe were preincubated with blocking solution, incubated with antidigoxigenin alkaline phosphatase conjugated antibody (1:5000, Roche) for 2 h and developed with 4-nitroblue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Roche) following the manufacturer's instructions.

Final processing

In all cases, the sections were mounted on coated slides, dehydrated, air-dried, and exposed to Kodak Biomax MR film (Eastman Kodak, Rochester, NY) for 6–12 d for p29 expression analysis and for 3 wk for colocalization studies. For cellular resolution, the sections were dipped in Hypercoat LM-1 photographic emulsion (Amersham Pharmacia Biotech), exposed for 20–30 d in the cold, developed with D19, fixed, dehydrated, and coverslipped. When only *in situ* hybridization was performed, the sections were counterstained with Richardson's blue.

Cytoarchitectonic analysis

The autoradiographic films were scanned in a Nikon Coolscan II slide scanner (Nikon Corp., Tokyo, Japan), at a resolution of 400 pixels/inch and printed. Optical observations and photographs were made in a Zeiss Axiophot microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and a Nikon digital camera Dn100. For the identification of brain structures, the atlas of Paxinos and Watson was followed (40).

Results

Regional distribution of p29 mRNA

Expression of p29 in rat brain was analyzed by *in situ* hybridization using a 327-nucleotide riboprobe synthesized from a DNA template encompassing nucleotides 1172–1499 from the published cDNA sequence. The probe hybridized to a 3.5-kb mRNA in Northern blots of cerebral cortex and cerebellum (Fig. 1A). Leonard et al. (22) reported a similar size mRNA in astrocytes. The distribution of p29 mRNA in brain slices obtained with this probe was identical to that using the oligonucleotide probes from other regions of the cDNA as described in the previous section (not shown). The data reported below were obtained using the 327-nucleotide riboprobe. A sense probe gave no signal (Fig. 1B).

p29 expression was analyzed in brains of euthyroid (Fig. 1, C1–C6) and hypothyroid (Fig. 1, D1–D6) rats on P16, an age when D2 expression and activity are highest in the brain (41). Further analysis using P60 euthyroid rats showed essentially the same pattern as on P16 (not shown). Briefly, highest p29 expression was found in the hippocampus, the neocortex, and the epithelial lining of the ventricles. p29 mRNA was also abundant in the choroid plexuses and the leptomeninges. Lower levels were found in the cerebellum and in several thalamic nuclei related to the reticular formation. White matter areas, such as the corpus callosum, were not labeled. The caudate and the olfactory bulb were almost devoid of p29 mRNA.

Looking at p29 expression in more detail, we found that in the cerebral cortex, p29 was mainly expressed in archicortex (hippocampus) and neocortex but hardly in paleocortex (olfactory cortex). In the hippocampus, there was an extremely high signal in the CA3 and CA4 regions of Ammon's horn, whereas CA1 and dentate gyrus were moderately labeled (Fig. 1, C4). Expression in the neocortex took place in all layers, except in layer I. There was a strong hybridization signal in layer IV and deep layer VI in frontal, agranular and parietal cortices (Fig. 1, C1–C4). However, in cingulate and

retrosplenial cortices highest expression was localized in layer II. The piriform cortex showed little hybridization despite its high cellular density (Fig. 1, C2–C4).

It was noteworthy that a considerable hybridization signal was present in the lining of the ventricles, with the strongest signal in the third ventricle (Fig. 1, C4–C5). There was also significant hybridization signal in the other areas of the blood-CSF barrier: the choroid plexuses and the leptomeninges. Due to the floating hybridization technique, the leptomeninges were not well preserved in all the sections, but they appeared clearly labeled as shown in Fig. 1 (arrows). Other sites of p29 expression were the basolateral amygdaloid nucleus (Fig. 1, C4) and some nuclei related to the reticular formation (paraventricular, laterodorsal, reticular, and parafascicular thalamic nuclei; some of them are shown in Fig. 1, C4–C5). p29 was also expressed in the dorsal lateral geniculate nucleus and in the zona incerta (Fig. 1, C5). In the cerebellum, there was a higher signal in the internal granular layer and in the lining of the fourth ventricle. There was also an appreciable signal in the facial nuclei (Fig. 1, C6).

In previous studies, we found that D2 mRNA was increased in specific brain regions in response to hypothyroidism (31). Regarding p29, there was no difference in p29 expression in most regions (Fig. 1, D1–D6), except for a slightly increased signal in the choroid plexuses (Fig. 1, D3–D5).

To obtain microscopic resolution, we performed emulsion autoradiography and counterstained the sections. Figure 2 shows bright and dark field images (A–E and A'–E', respectively) of relevant sites of p29 expression. In the somatosensory cortex (Fig. 2, A and A'), there was no signal in layer I and few silver grains in layers II–III, whereas layer V shows a medium label. The strongest radioactive signal was seen over layer IV and deep layer VI. In the hippocampus (Fig. 2, B, B', C, and C'), there was a high density of silver grains in the pyramidal layers of the CA3 and CA4 regions, with much less hybridization signal in the granular layer of the dentate gyrus. There were also groups of silver grains that formed the shape of individual cellular somas in the polymorphic layer of the dentate gyrus; these cells were characterized as neurons (see next section).

There was a discrete signal over the lining of the third ventricle (Fig. 2, D and D'); the silver grains were located in the soma of ependymocytes and tanycytes and in their processes to the ventricle as shown at higher magnification in Fig. 2, E and E'. The autoradiographic analysis in hypothyroid rat brain showed an almost identical p29 expression to that found in normal brain (data not shown).

Cellular characterization of p29 expressing cells

The cells expressing p29 mRNA were characterized by analyzing their morphology and the expression of specific protein markers. To achieve this, we performed *in situ* hybridization combined with Nissl staining or with immunohistochemistry in the same tissue slice. We used antibodies against glial fibrillary acidic protein expressed mainly by astroglial cells, and against calbindin and parvalbumin expressed by subpopulations of interneurons.

Besides expression in ependymocytes and tanycytes, as

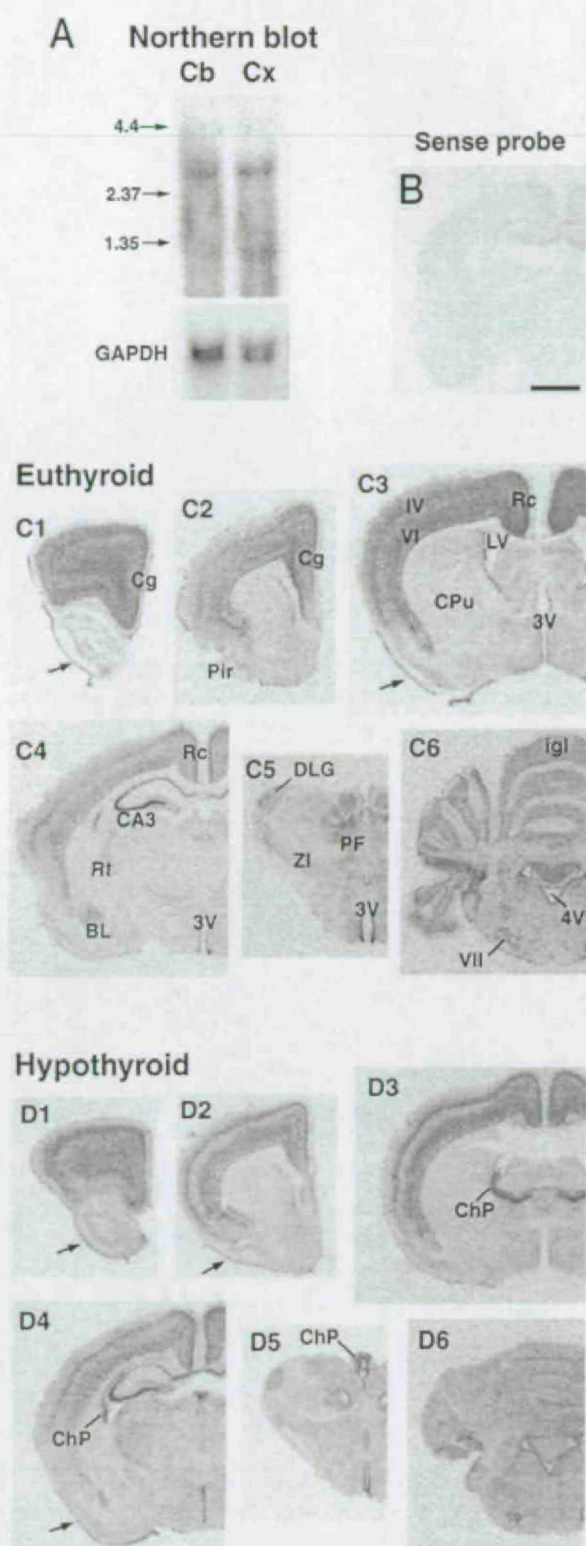


FIG. 1. Regional expression of p29 in brain of normal and hypothyroid rats. A, Northern blot of p29 in the cerebellum (Cb) and cerebral cortex (Cx); the arrows show the size of RNA standards. The size of the p29 band was read from the regression line obtained in a semilog plot of standard mRNA sizes *vs.* distance migrated in the electrophoresis gel. A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase probe was used for control of RNA loading. B, Brain slice hybridized with a sense riboprobe. In panels C and D, the sections are organized from anterior to posterior levels. C1–C6, Expression of p29 in slices from an euthyroid rat. D1–D6, Expression in

mentioned above, the data indicate that p29 is expressed in neurons, mainly pyramidal neurons. As shown above, p29 expression in the hippocampus took place mainly in pyramidal layers. This was confirmed by emulsion photography that showed the hybridization grains over pyramidal cells (Fig. 3A). Also in the neocortex, the silver grains were associated to neurons. p29 expression was strong in layer IV and deep layer VI. In layer IV and VI, the grains were aggregated resembling round shapes of large and medium sizes (Fig. 3B). Many calbindin positive interneurons express p29 in layer IV and some of them in layer VI (Fig. 3E) and in the polymorphic layer of the dentate gyrus. However, the parvalbumin immunopositive cells in the neocortex did not contain silver grains (Fig. 3F). Neuronal expression of p29 was also strongly supported by the finding of silver grains over large neurons of the reticular formation gigantocellularis in the medulla (Fig. 3C). The white matter was devoid of p29 mRNA, and there was no signal over oligodendrocytes recognized by their morphology and disposition in linear arrays (Fig. 3B). Figure 3D shows p29 expression in ependymocytes and the choroid plexus.

Lack of colocalization of p29 and D2 mRNAs

To assess a possible functional relationship between p29 and D2, we examined whether or not both molecules were simultaneously present in some subsets of cells. To this end, we used a D2 radioactive probe together with a p29 probe labeled with digoxigenin. The mixed probes were used for *in situ* hybridization on P16 brain slices. Regional expression of D2 was identical to that previously reported (31). As was expected from the results described above regarding p29 expression, both mRNAs were located in different cellular groups throughout the brain. At the regional level, D2 was expressed in some regions which lack p29, such as the caudate, whereas others, such as the amygdala expressed p29 but not D2 (not shown). D2 was not expressed in the ependymocytes lining the ventricles, the leptomeninges, and the choroid plexuses, places with prominent p29 expression (Fig. 1).

In other regions, such as the neocortex and the hippocampus both mRNAs were expressed, but in different layers or cell types. Figure 4, A and A', shows that layer I of the neocortex expressed D2 but not p29, which was present in neurons at the upper border of layer II. These neurons did not express D2. In the hippocampus, D2 was clearly present in the molecular layer of the dentate gyrus, where it was expressed in astrocytes, whereas p29 was expressed in the granular and pyramidal layers (Fig. 4, B and B').

The only cells that appeared to express both mRNAs were the tanocytes, a specialized type of glial cells, which replace the ependymocytes in the bottom of the third ventricle (Fig.

a hypothyroid rat. Cg, Cingulate cortex; Pir, piriform cortex; IV and VI, layers of the neocortex; Rc, retrosplenial cortex; LV, lateral ventricle; CPu, caudate-putamen; CA3, field 3 of Ammon's horn; Rt, reticular thalamic nucleus; BL, basolateral amygdaloid nucleus; 3V and 4V, third and fourth ventricles; PF, parafascicular nucleus; DLG, dorsolateral geniculate nucleus; ZI, zona incerta; Igl, internal granular layer; VII, facial nucleus; ChP, choroid plexuses. Arrows in C1, C3, D1, D2, and D4 point to the meninges. Scale bar, 0.2 cm.

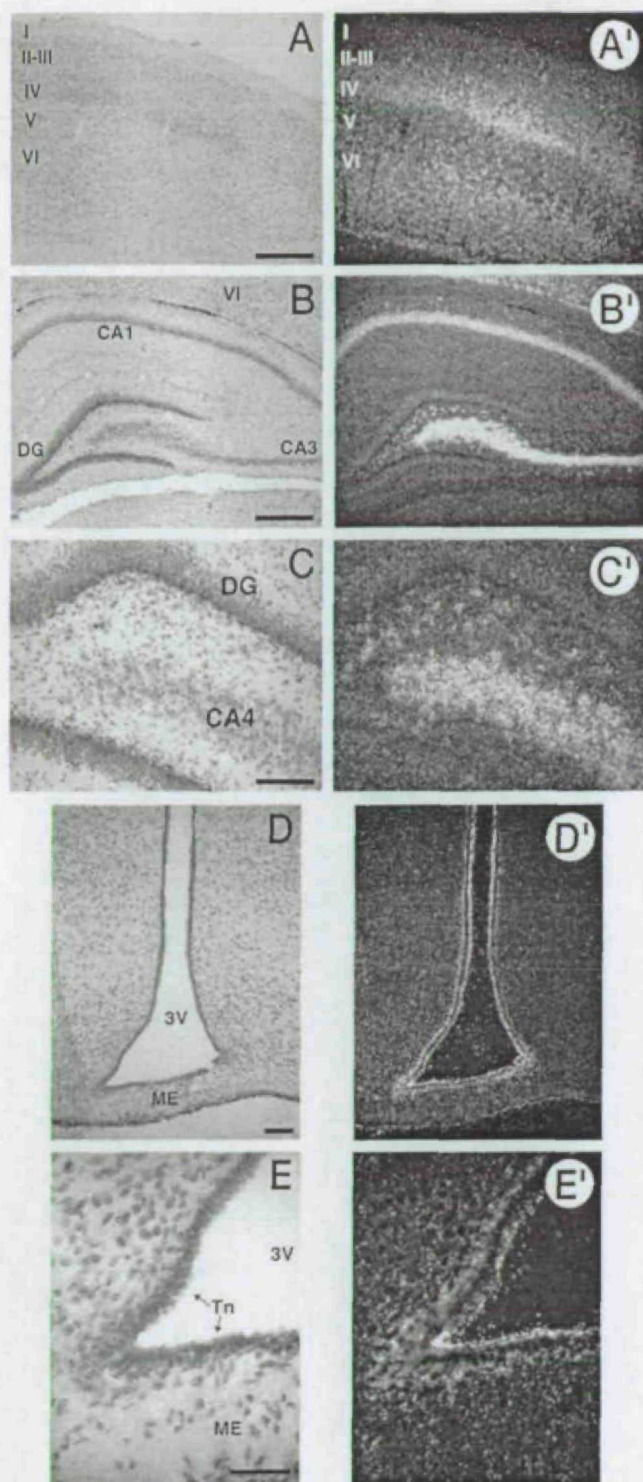


FIG. 2. Bright field (left panels) and dark field (right panels) microphotographs of p29 expression. *In situ* hybridization was performed using a p29 radioactively labeled riboprobe. After hybridization, the sections were covered with photographic emulsion, exposed, and developed to reveal the silver grains (white signal in right panels). The sections were then counterstained to reveal the cellular distribution (left panels). Layers of cerebral neocortex are labeled I to VI. DG, Dentate gyrus; CA1–4, fields of Ammon's horn; Po, polymorphic layer of the dentate gyrus; 3V, third ventricle; ME, median eminence; Tn, tanycytes. Scale bars in A and B, 500 μ m; in C and D, 100 μ m; and in E, 50 μ m.

4, C and C'). The tanycytes are the cells with the highest D2 expression in brain (32, 33). However, whereas p29 mRNA was present mainly in the tanycyte bodies, D2 was present in the tanycyte processes, and their feet near the median eminence. In the median eminence, p29 expression was high in the leptomeninges (Fig. 4, C and C').

Discussion

The goal of this work was to explore a possible functional relationship between D2 and the putative T_4 -binding protein p29 *in vivo*. Studies *in vitro* indicate that p29 overexpression increases D2 activity 100 times, and the use of specific antibodies against p29 led to immunoprecipitation of 5'-deiodinase activity both in astrocyte cultures and in microsomal fractions isolated from hypothyroid BAT and cerebral neocortex. In addition, direct injection of recombinant Ad5-p29 virus particles in the neocortex slightly increased (2 \times) 5'-deiodinase activity (22).

As an initial approach, we performed *in situ* hybridization studies to determine whether the two genes were expressed in the same groups of cells in the brain. Studying mRNA distribution has obvious limitations. However, the study of D2 protein distribution is hampered by lack of antibodies suitable for immunohistochemistry and probably extremely low cellular concentrations of the protein. Nevertheless, the regional heterogeneity of the central nervous system allows inferring the existence of functional relationships among different molecules from expression correlates. As described previously, D2 was mainly expressed in the tanycytes lining the inferior walls of the third ventricle, and also in brain structures such as the cerebral neocortex, hippocampus, caudate, midbrain, brain stem, and cerebellum (32, 33). p29 was expressed in the neocortex, hippocampus, cerebellum, amygdala, and some thalamic nuclei related to the reticular formation. It was absent from the caudate, one of the regions where D2 is expressed. Other sites of prominent p29 expression include the leptomeninges, the epithelial cells of the choroid plexuses, the ependymocytes, and the tanycytes. In regions where both D2 and p29 were expressed, they were present in different layers or in different groups of cells. D2 is expressed in astrocytes (32), whereas p29 is localized in neurons. The only cells that appeared to coexpress both mRNAs were the tanycytes, but given the lack of coexpression elsewhere, it is doubtful that the eventual presence of both proteins in the tanycytes reflects any functional relation between them.

D2 expression in rat brain is influenced by developmental and physiological factors. Enzyme activity and mRNA abundance are highest during the postnatal period than in fetal life and are also regulated by the thyroidal status. Hypothyroidism induced an increase in D2 activity in total brain and cerebral cortex (27, 28, 30). Iodine deficiency also increased D2 mRNA and activity in brain (29, 42). As we have shown previously, profound hypothyroidism induced an increased D2 mRNA in the relay nuclei of somatosensory and auditory pathways, which could be thought as being especially protected from low T_3 by an increased D2 activity (31). D2 mRNA expression also increases severalfold in the tanycytes after hypothyroidism (33). In contrast, except for a slightly

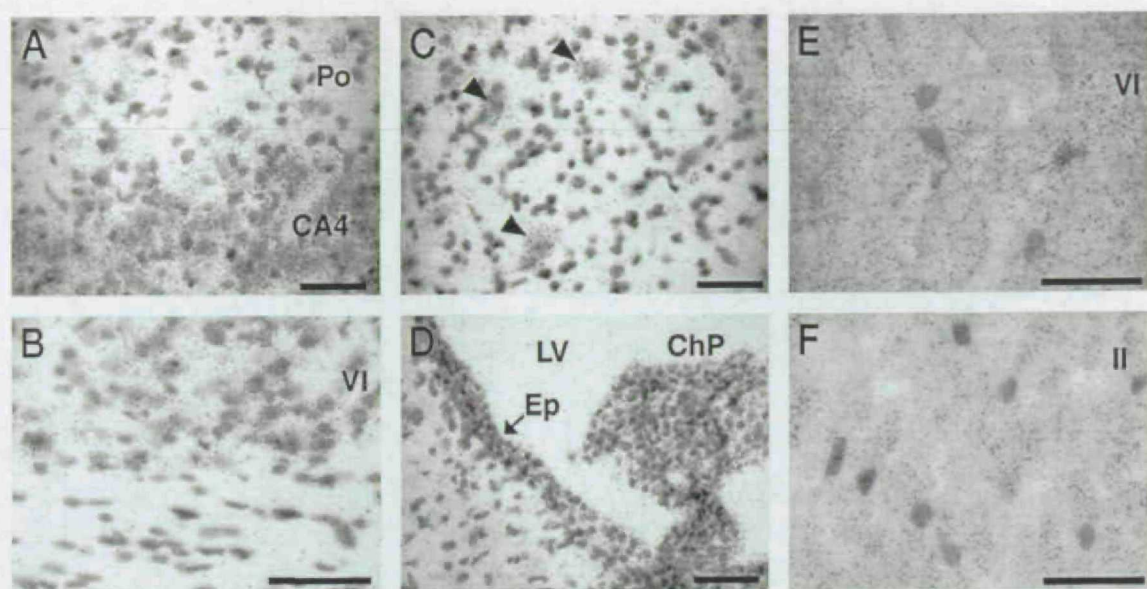


FIG. 3. Expression of p29 at the cellular level. *In situ* hybridization using emulsion microphotography was combined with Nissl staining (A–D) or with immunohistochemistry with specific antibodies for calbindin (E) or parvalbumin (F). Po, Polymorphic layer of the dentate gyrus; CA4, field of the Ammon's horn; II and VI, layers of the cerebral neocortex; LV, lateral ventricle; ChP, choroid plexus; Ep, ependymocytes. Arrowheads point to giant neurons in the reticular formation *giganto cellularis*. Scale bars, 100 μ m.

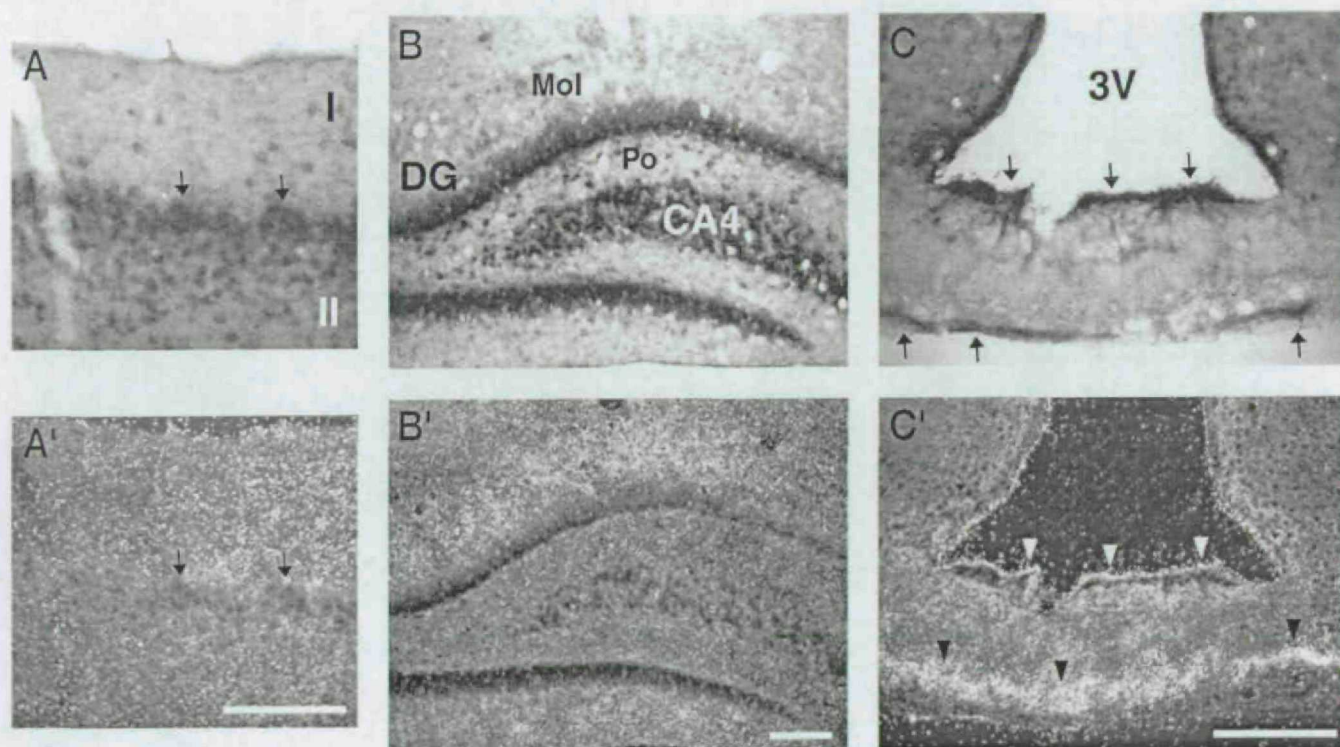


FIG. 4. Simultaneous detection of p29 and D2 mRNAs. Double *in situ* hybridization with a p29 digoxigenin-labeled riboprobe (blue staining) and a D2 radioactively labeled riboprobe (hybridization grains). The upper panels show bright-field, and the lower panels, dark-field images. I–II, Layers of retrosplenial cortex; DG, dentate gyrus; CA4, field of Ammon's horn; Po, polymorphic layer of the dentate gyrus; Mol, molecular layer of the dentate gyrus. Arrows point to p29 mRNA signal in layer II of the retrosplenial cortex and in tanycytes somas and in meninges. Arrowheads point to D2 mRNA signal in tanycytes somas (white) and tanycytes feet (black) at the median eminence. Scale bars, 150 μ m.

increased expression of p29 in the choroid plexuses, expression of p29 was not altered by hypothyroidism in most regions.

It is intriguing that p29 was expressed all along the whole

cell layer covering the ventricles, as ependymocytes and tanycytes, and also forming the epithelial layer of the choroid plexuses and the arachnoid membrane. The mechanisms of T_4 transport in the brain are at present not well understood.

Both T_4 and T_3 can enter the brain through the blood-brain and the cerebrospinal fluid-brain barriers (43). The passage through the blood-CSF barrier, *i.e.* through the epithelial cells lining the ventricular side of the choroid plexus, was thought to be facilitated by locally synthesized transthyretin. However, results from transthyretin knockout animals do not support this hypothesis (44, 45). p29 was originally identified as a putative T_4 -binding protein (15). If indeed p29 binds T_4 *in vivo*, then its expression in cells lining the brain-CSF interface may suggest a function of p29 in T_4 transport to and from the CSF. More studies are clearly needed to explore this possibility.

Rat p29 shows very high sequence similarity with mouse Dkk-3, a member of the Dickkopf protein family, which have a role during *Xenopus* development (23). Given their high sequence similarity, p29 might be considered as the rat homolog of Dkk-3. In fact, the p29 sequence appears in the GenBank database defined as the rat Dkk-3 homolog with accession no. NM_138519. On the other hand, the derived protein sequence lacks the signal peptide that makes all Dickkopf family members secreted glycoproteins. Close comparison of the reported p29 sequence with that of mouse Dkk-3, however, reveals a high sequence similarity, with conserved nucleotide substitutions also in the region encoding the Dkk-3 signal peptide. Dkk-3 is expressed in the ventricular zones of developing brain and spinal cord (24), resembling the ventricular localization of p29 found in the postnatal rat brain. Although expression of mouse Dkk-3 has not been studied in detail, in the adult it is expressed in the hippocampus and cerebral neocortex in a pattern very similar to that described for p29 in our work (23).

In summary, we found that in most regions of the brain p29 and D2 show dissimilar distributions. This argues against the hypothesis that p29 is part of a D2 multienzyme complex. Related functions for p29, such as a role in T_4 transport, cannot be discarded. Such a role would be compatible with its prominent expression in cells lining the choroid plexuses and the walls of the ventricles.

Acknowledgments

We acknowledge Drs. Javier DeFelipe and Estrella Rausell for helpful discussion and interpretation of results; Fernando Núñez, Pablo Señor, and Miguel Marsa for the care of animals; and Luis Almonacid for technical help.

Received August 7, 2002. Accepted November 7, 2002.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Juan Bernal, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. E-mail: jbernal@iib.uam.es.

This work was supported by Grants PM980118 and BFI2001-2412 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, and QLG3-2000-00930 from the European Union. A.M.-P. is recipient of a fellowship from the Ministry of Science and Technology, Spain. A.G.-F. is recipient of a contract from the Ramón y Cajal Program of the Ministry of Science and Technology, Spain.

References

1. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38–89
2. Leonard JL, Köhrle J 2000 Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner and Ingbar's the thyroid: a*

fundamental and clinical text. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 136–173

3. Köhrle J 1999 Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol* 151:103–119
4. Leonard JL, Visser TJ 1986 Biochemistry and deiodination. In: Hennemann G, ed. *Thyroid hormone metabolism*. New York: Marcel Dekker Inc.; 189–229
5. Croteau W, Davey JC, Galton VA, St. Germain DL 1996 Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase: a selenoprotein differentially expressed and regulated in the human brain and other tissues. *J Clin Invest* 98:405–417
6. Berry MJ, Larsen PR 1993 Molecular cloning of the selenocysteine-containing enzyme type I iodothyronine deiodinase. *Am J Clin Nutr* 57(Suppl 2):249–255
7. Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ, St. Germain DL 1995 Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 270:16569–16575
8. Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR 1996 Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology* 137:3308–3315
9. St. Germain DL, Galton VA 1997 The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 7:655–668
10. Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR 1991 Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353:273–276
11. Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warner RL, Larsen PR 1992 Cloning and *in vitro* expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1133–1139
12. Buettner C, Harney JW, Larsen PR 1998 The 3'-untranslated region of human type 2 iodothyronine deiodinase mRNA contains a functional selenocysteine insertion sequence element. *J Biol Chem* 273:33374–33378
13. Curcio C, Baqui MM, Salvatore D, Rihn BH, Mohr S, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC 2001 The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. *J Biol Chem* 276:30183–30187
14. Schneider MJ, Fiering SN, Pallud SE, Parlow AF, St. Germain DL, Galton VA 2001 Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T_4 . *Mol Endocrinol* 15:2137–2148
15. Farwell AP, Leonard JL 1989 Identification of a 27-kDa protein with the properties of type II iodothyronine 5'-deiodinase in dibutyl cyclic AMP-stimulated glial cells. *J Biol Chem* 264:20561–20567
16. Safran M, Farwell AP, Leonard JL 1996 Catalytic activity of type II iodothyronine 5'-deiodinase polypeptide is dependent upon a cyclic AMP activation factor. *J Biol Chem* 271:16363–16368
17. Safran M, Farwell AP, Leonard JL 1991 Evidence that type II 5'-deiodinase is not a selenoprotein. *J Biol Chem* 266:13477–13480
18. Chanoine JP, Safran M, Farwell AP, Tranter P, Ekenbarger DM, Dubord S, Alex S, Arthur JR, Beckett GJ, Braverman LE, Leonard JL 1992 Selenium deficiency and type II 5'-deiodinase regulation in the euthyroid and hypothyroid rat: evidence of a direct effect of thyroxine. *Endocrinology* 131:479–484
19. Salvatore D, Harney JW, Larsen PR 1999 Mutation of the Secys residue 266 in human type 2 selenodeiodinase alters 75Se incorporation without affecting its biochemical properties. *Biochimie (Paris)* 81:535–538
20. Berry MJ, Kieffer JD, Larsen PR 1991 Evidence that cysteine, not selenocysteine, is in the catalytic site of type II iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* 129:550–552
21. Leonard JL, Leonard DM, Safran M, Wu R, Zapp ML, Farwell AP 1999 The mammalian homolog of the frog type II selenodeiodinase does not encode a functional enzyme in the rat. *Endocrinology* 140:2206–2215
22. Leonard DM, Stachelek SJ, Safran M, Farwell AP, Kowalik TE, Leonard JL 2000 Cloning, expression, and functional characterization of the substrate binding subunit of rat type II iodothyronine 5'-deiodinase. *J Biol Chem* 275:25194–25201
23. Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA 1999 Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238:301–313
24. Monaghan AP, Kioschis P, Wu W, Zuniga A, Bock D, Poustka A, Delius H, Niehrs C 1999 Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech Dev* 87:45–56
25. Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, Inoue Y, Namba M 2000 A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 268:20–24
26. Bernal J 2002 Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest* 25:268–288
27. Leonard JL, Kaplan MM, Visser TJ, Silva JE, Larsen PR 1981 Cerebral cortex responds rapidly to thyroid hormones. *Science* 214:571–573
28. Silva JE, Gordon MB, Crantz FR, Leonard JL, Larsen PR 1984 Qualitative and quantitative differences in the pathways of extrathyroidal triiodothyronine generation between euthyroid and hypothyroid rats. *J Clin Invest* 73:898–907
29. Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Calvo R, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G 1991 Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology* 129:2663–2673

30. Escobar-Morreale HF, Obregon MJ, Hernandez A, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G 1997 Regulation of iodothyronine deiodinase activity as studied in thyroidectomized rats infused with thyroxine or triiodothyronine. *Endocrinology* 138:2559–2568
31. Guadaño-Ferraz A, Escámez MJ, Rausell E, Bernal J 1999 Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J Neurosci* 19:3430–3439
32. Guadaño-Ferraz A, Obregón MJ, St-Germain D, Bernal J 1997b The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10391–10396
33. Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM 1997 Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138:3359–3368
34. Riskind PN, Kolodny JM, Larsen PR 1987 The regional hypothalamic distribution of type II 5'-monodeiodinase in euthyroid and hypothyroid rats. *Brain Res* 420:194–198
35. Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennström B, Bernal J 2002 Deletion of the thyroid hormone receptor 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3985–3989
36. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
37. Iñiguez MA, De Lecea L, Guadaño-Ferraz A, Morte B, Gerendasy D, Sutcliffe JG, Bernal J 1996 Cell-specific effects of thyroid hormone on RC3/neurogranin expression in rat brain. *Endocrinology* 137:1032–1041
38. Bernal J, Guadaño-Ferraz A 2002 Analysis of thyroid hormone-dependent genes in the brain by in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 202:71–90
39. Guadaño-Ferraz A, Escámez MJ, Morte B, Vargiu P, Bernal J 1997 Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain. *Mol Brain Res* 49:37–44
40. Paxinos G, Watson C 1986 The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press, Inc.
41. Kaplan MM, Yaskoski KA 1981 Maturation patterns of iodothyronine phenolic and tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum, and hypothalamus. *J Clin Invest* 67:1208–1214
42. Peeters R, Fekete C, Goncalves C, Legradi G, Tu HM, Harney JW, Bianco AC, Lechan RM, Larsen PR 2001 Regional physiological adaptation of the central nervous system deiodinases to iodine deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E54–E61
43. Dratman MB, Crutchfield FL, Schoenhoff MB 1991 Transport of iodothyronines from bloodstream to brain: contributions by blood:brain and choroid plexus:cerebrospinal fluid barriers. *Brain Res* 554:229–236
44. Palha JA, Fernandes R, de Escobar GM, Episkopou V, Gottesman M, Saraiva MJ 2000 Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model. *Endocrinology* 141:3267–3272
45. Palha JA, Hays MT, Morreale de Escobar G, Episkopou V, Gottesman ME, Saraiva MJ 1997 Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice. *Am J Physiol* 272:E485–E493

Generation and Characterization of *dickkopf3* Mutant Mice

Ivan del Barco Barrantes,^{1†} Ana Montero-Pedrazuela,² Ana Guadaño-Ferraz,² Maria-Jesus Obregon,²
Raquel Martinez de Mena,² Valérie Gailus-Durner,³ Helmut Fuchs,³ Tobias J. Franz,⁴
Svetoslav Kalaydjiev,⁴ Martina Klempt,⁵ Sabine Hölter,⁶ Birgit Rathkolb,⁵
Claudia Reinhard,⁷ Gabriella Morreale de Escobar,² Juan Bernal,²
Dirk H. Busch,⁴ Wolfgang Wurst,⁶ Eckhard Wolf,⁵
Holger Schulz,⁷ Svetlana Shtrom,⁸ Erich Greiner,⁹
Martin Hrabé de Angelis,³ Heiner Westphal,⁸
and Christof Niehrs^{1*}

Division of Molecular Embryology¹ and Molecular Biology of the Cell I,⁹ Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg, Germany; Department of Molecular Endocrinology, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier 4, E-28029 Madrid, Spain²; Institute of Experimental Genetics,³ Institute of Developmental Genetics,⁶ and Institute for Inhalation Biology,⁷ GSF-National Research Center for Environment and Health, Ingolstaedter Landstr. 1, D-85758 Neuherberg, Germany; Institute for Medical Microbiology, Immunology, and Hygiene, Technical University of Munich, Trogerstr. 9, D-81675 Munich, Germany⁴; Institute of Molecular Animal Breeding and Biotechnology, Gene Center, Ludwig Maximilian University of Munich, Feodor-Lynen-Strasse 25, 81377 Munich, Germany⁵; and National Institutes of Health, 9000 Rockville Pike, Bethesda, Maryland 20892-2790⁸

Received 6 October 2005/Returned for modification 19 November 2005/Accepted 21 December 2005

dickkopf (*dkk*) genes encode a small family of secreted Wnt antagonists, except for *dkk3*, which is divergent and whose function is poorly understood. Here, we describe the generation and characterization of *dkk3* mutant mice. *dkk3*-deficient mice are viable and fertile. Phenotypic analysis shows no major alterations in organ morphology, physiology, and most clinical chemistry parameters. Since *Dkk3* was proposed to function as thyroid hormone binding protein, we have analyzed deiodinase activities, as well as thyroid hormone levels. Mutant mice are euthyroid, and the data do not support a relationship of *dkk3* with thyroid hormone metabolism. Altered phenotypes in *dkk3* mutant mice were observed in the frequency of NK cells, immunoglobulin M, hemoglobin, and hematocrit levels, as well as lung ventilation. Furthermore, *dkk3*-deficient mice display hyperactivity.

The Dickkopf family of secreted proteins consists of four members, which share two conserved cysteine-rich domains (12, 24). The hallmark of Dkk proteins is that they function as Wnt antagonists or agonists by binding to and inhibiting or activating the Wnt coreceptor LRP6 (1, 31, 45). They show regionalized expression during vertebrate embryogenesis (5, 10, 13, 18, 20, 33, 46). *Dkk1* is the best-characterized member of the family. It acts as an embryonic head inducer, and when overexpressed it will induce extra heads in *Xenopus* and zebra fish (6, 12, 18, 22, 36, 46). *dkk1* mutant mice are embryonic lethal, and embryos lack anterior head structure and display fused digits (36). *dkk2* mouse mutants are viable but show bone defects (28). Little is known about the biological role of *dkk4*.

By a number of criteria, *dkk3* appears as a divergent member of the *dkk* family. (i) By DNA sequence similarity, vertebrate *dkk1*, -2, and -4 are more related to each other than they are to

dkk3 (12). (ii) Hydra has two *dkk* genes, one related to vertebrate *dkk1*, -2, and -4 (16) and one related to vertebrate *dkk3* (9). This suggests an ancient phylogenetic separation between these family members, where *dkk1*, -2, and -4 but not *dkk3* arose by gene duplication from an ancestral *dkk* (16). (iii) Soggy is a protein of unknown function with sequence similarity to *dkk3* but not to other *dkk* genes (24). The similarity is most pronounced outside the two conserved Dkk cysteine-rich domains, raising the possibility that the gene arose from an ancestral *dkk3* precursor. (iv) Unlike *Dkk1*, -2, and -4, *Dkk3* does not act as a Wnt modulator (24, 29, 55). While all other tested Dkk proteins bind to and modulate the Wnt receptor LRP6, as well as the Dkk coreceptor Kremen, *Dkk3* has no affinity to these transmembrane proteins (7, 30, 32, 33), and no other proteins are known to interact with it.

Like other *dkk* members, *dkk3* is expressed during vertebrate development in suggestive patterns in many organs (7, 33). Prominent expression of *dkk3* is observed in the brain and in fibroblasts of adult rodents (17, 24, 34, 37, 56) and in the human adrenal cortex (50). *Dkk3* has been proposed to act as a tumor suppressor, as it is downregulated in a number of tumor cells and since *dkk3* overexpression suppresses cell growth (19, 25, 37, 52, 53). Hence, *dkk3* is also known as *REIC* (for reduced expression in immortalized cells) (52). While hy-

* Corresponding author. Mailing address: Division of Molecular Embryology, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg, Germany. Phone: 49-6221-42-4690. Fax: 49-6221-42-4692. E-mail: niehrs@dkfz-Heidelberg.de.

† Present address: Cell Signalling Group, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain.

permethylation of human *dkk3* correlates with certain cancers (23, 43), the physiological relevance of altered *dkk3* expression in tumors and its potential growth inhibitory effect are unknown.

A cDNA encoding an N-terminally truncated Dkk3 lacking the signal peptide was cloned and characterized as a presumed substrate binding subunit, "p29," of the type II iodothyronine 5'-deiodinase (D2) in rat (26). The evidence for a role for p29 in thyroid hormone metabolism rests on the findings that p29 can be cross-linked to a thyroid hormone affinity label and that transfection of p29, directly or indirectly, enhances D2 activity in cultured astrocytes (26). Deiodinases play an important role in the local availability of brain, brown adipose tissue (BAT), and pituitary 3,5,3'-triiodothyronine (T3), which is converted from thyroxine (T4) by deiodination (2). This is different from other organs, which derive their T3 directly from plasma. All deiodinases (D1, D2, and D3) thus far characterized are selenoproteins that catalyze the removal of iodine atoms from iodoamino acids (4). The claim that an N-terminally truncated rat Dkk3 (p29) may be involved in D2 activity is controversial because (i) of the seleno nature of all other cloned deiodinases that act without substrate binding subunits and (ii) there is poor correlation between *dkk3/p29* and the D2 expression patterns in rat brain (34).

In summary, despite numerous studies of *dkk3*, its biological role and biochemical function remain largely elusive. We have therefore generated *dkk3* mutant mice by targeted disruption of the gene. Here, we present a first phenotypic characterization of these mice. Our data indicate that the gene is not essential for embryogenesis and viability, and the data do not support a role for Dkk3 in thyroid hormone metabolism. Instead, initial phenotyping indicates altered phenotypes in hematological and immunology parameters, lung ventilation, and behavior in *dkk3* mutant mice.

MATERIALS AND METHODS

Generation of *dkk3* mutant mice. The targeting vector was derived from a 129/SVJ bacterial artificial chromosome clone that includes exon 2 from the *dkk3* gene. The construct, which replaced most of exon 2, consisted of an in-frame-cloned *lacZ* cassette, followed by a *loxP*-flanked neomycin resistance (*neo*) cassette, a 4-kb 5' homology arm, and a 4.5-kb 3' homology arm. The A subunit of diphtheria toxin was used as a counterselection marker (Fig. 1A). 129/SVJ embryonic stem (ES) cells were electroporated, and correct recombination events were verified by Southern blot analysis of genomic DNA digested with BamHI, using both internal and external probes (Fig. 1B and C). Injection of two independent positive clones generated chimeras, which transmitted the recombinant locus. No difference was evident between the two lines, and we used one for further study. Genotyping of *dkk3*^{-/-} mice was performed by a triplex PCR on genomic tail DNA using oligonucleotides p1 (5'-GATAGCTTCCGGGACACAC-3'), p2 (5'-TCCATCAGCTCCCTCCACTCT-3'), and p3 (5'-TAAGTTGGGTAACGCCAGGGT-3') (Fig. 1A and B) to produce 220-bp and 199-bp bands from the wild-type (WT) and targeted allele, respectively (Fig. 1D). *dkk3* mutant mice were maintained in a C57BL/6 background. A group of 60 *Dkk3* knockout animals, 30 males and 30 females, were observed during 12 months and compared to wild-type animals. No increase in mortality and no spontaneous tumor formation were observed with the *Dkk3* knockout mice.

German Mouse Clinic (GMC) screen. General set up of the screen, husbandry, and multiparameter analysis were as previously described (11) and will be described in detail elsewhere.

Behavior screen. Mice were analyzed with the behavior screen at the age of 9 weeks (after 2 weeks of acclimatization in the module). Three days before being tested, an object (a metal cube) was placed into the home cage and removed 1 day before testing. The modified hole board test was carried out by standardized procedures as described previously (40, 41). For each trial (5-min observation

time), an unfamiliar object (a blue plastic tube lid, similar in size to the metal cube) and the familiar object (a metal cube) were placed into the test arena with a distance of 2 cm between them. Manually recorded behavioral data were analyzed using Observer 4.1 software (Noldus, Wageningen, The Netherlands), the animal's track was videotaped, and its locomotor path was analyzed with a video tracking system (Ethovision 2.3, Noldus, Wageningen, The Netherlands). Data were statistically analyzed with SPSS software (SPSS, Inc., Chicago, Ill.). The chosen level of significance was a *P* value of <0.05.

Clinical-chemical and hematological screen. For the hematological investigations, 50 μ l of blood per 12-week-old mouse was collected in an EDTA-coated tube (catalogue no. 078035; KABE) by puncturing the retro-orbital sinus with a nonheparinized glass capillary (0.8 mm in diameter, catalogue no. 1.28.13.1.2; Labortechnik K&K, Munich, Germany) under ether anesthesia. The sample was immediately inverted several times to ensure a homogenous mixture of blood and anticoagulant and used for automated analysis with a blood analyzer, which was carefully validated for the analysis of mouse blood (ABC-Blutbild analyzer; Scil Animal Care Company GmbH, Viernheim, Germany). The influence of gender and genotype were tested by applying a two-way analysis of variance (variance equal) or general linear model (variance unequal). In the case of a significant influence of genotype on the parameter investigated, the significance of the mean differences within each sex was evaluated by the Student *t* test.

Lung function screen. When mice were 14 weeks old, whole-body plethysmography (8) was applied to measure spontaneous breathing patterns of unrestrained animals (51) at different levels of activity. Automated data analysis provided tidal volumes (TV), respiratory rates (f), minute ventilation (MV), inspiratory and expiratory times (Ti, Te), and peak inspiratory and peak expiratory flow rates (PIF and PEF) at 10-s intervals. Mean inspiratory and expiratory flow rates (MEF and MIF) were calculated from the ratio of tidal volume and the respective time interval. The fraction of inspiration (Ti/TT) was determined from the ratio of inspiratory time (Ti) to total time required for the breathing cycle (TT). Specific tidal volumes and minute ventilations (sTV and sMV) were calculated by relating the absolute values to the body weight of the animal. Breathing was analyzed for the above-mentioned parameters during phases of activity and rest. Statistical analyses were performed with a commercially available statistics package (Statgraphics; Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD). Differences between strains were evaluated by Student's *t* test. Statistical significance was assumed at a *P* value of <0.05. Data are presented as mean values \pm standard error of the mean (SEM).

Immunology screen. Blood samples were taken from 12-week-old mice. Peripheral blood leukocytes were isolated from 500 μ l blood by erythrocyte lysis with NH₄Cl (0.17 M)-Tris buffer (pH 7.45) directly in 96-well microtiter plates. After subsequent washing with fluorescence-activated cell sorter staining buffer (phosphate-buffered saline [PBS], 0.5% bovine serum albumin, 0.02% sodium azide, pH 7.45), peripheral blood leukocytes were incubated for 20 min with 1 μ M ethidium monazide bromide (Molecular Probes, The Netherlands) and Fc block (clone 2.4G2; PharMingen, San Diego, Calif.). Ethidium monazide bromide bound to the DNA of dead cells was photo-cross-linked by brief light exposure. Cells were then stained with fluorescence-conjugated monoclonal antibodies (PharMingen). The following main cell populations were analyzed: B cells (CD19⁺ clone 1D3), B1 B cells (CD19⁺ CD5⁺; clone 53-7.3), B2 B cells (CD19⁺ CD5⁻), T cells (CD3⁺; clone 145-2C11), CD4⁺ T cells (clone RM4-5), CD8⁺ T cells (CD8 β ; clone H35-17.2), γ/δ T cells (clone GL3), granulocytes (Gr-1⁺; clone RB6-8C5), and NK cells (CD49b⁺; clone DX5). Data were acquired on a FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, Calif.) and were analyzed using FlowJo software (TreeStar Inc.). All samples were acquired until a total number of 25,000 cells were reached. The plasma levels of immunoglobulin M (IgM), IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, and IgA were determined by standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assays using goat anti-mouse immunoglobulin antibodies and alkaline phosphatase conjugates (SouthernBiotech, Birmingham, Ala.).

Animals and treatments for D2 studies. C57BL/6 animals were kept under temperature-controlled (22 \pm 2°C) and light-controlled (12-h light and 12-h dark cycle; lights on at 0700 h) conditions and had free access to food and water. Animal care procedures were conducted in accordance with the guidelines set by European Community Council Directives (86/609/EEC).

For *in situ* hybridization studies, 11-day-old (P11) male wild-type and *dkk3* mutant mice were used. This postnatal day was chosen because it is comparable to the age at which the highest levels of D2 activity and expression are found in rat brain (15, 21). For the determinations of deiodinase activities and thyroid hormones levels, four months-old mice were used from both wild-type and *dkk3* mutant mice. As we observed sex-related differences in these determinations with several tissues, groups of males and females of both groups were used (7 to 12 mice per group).

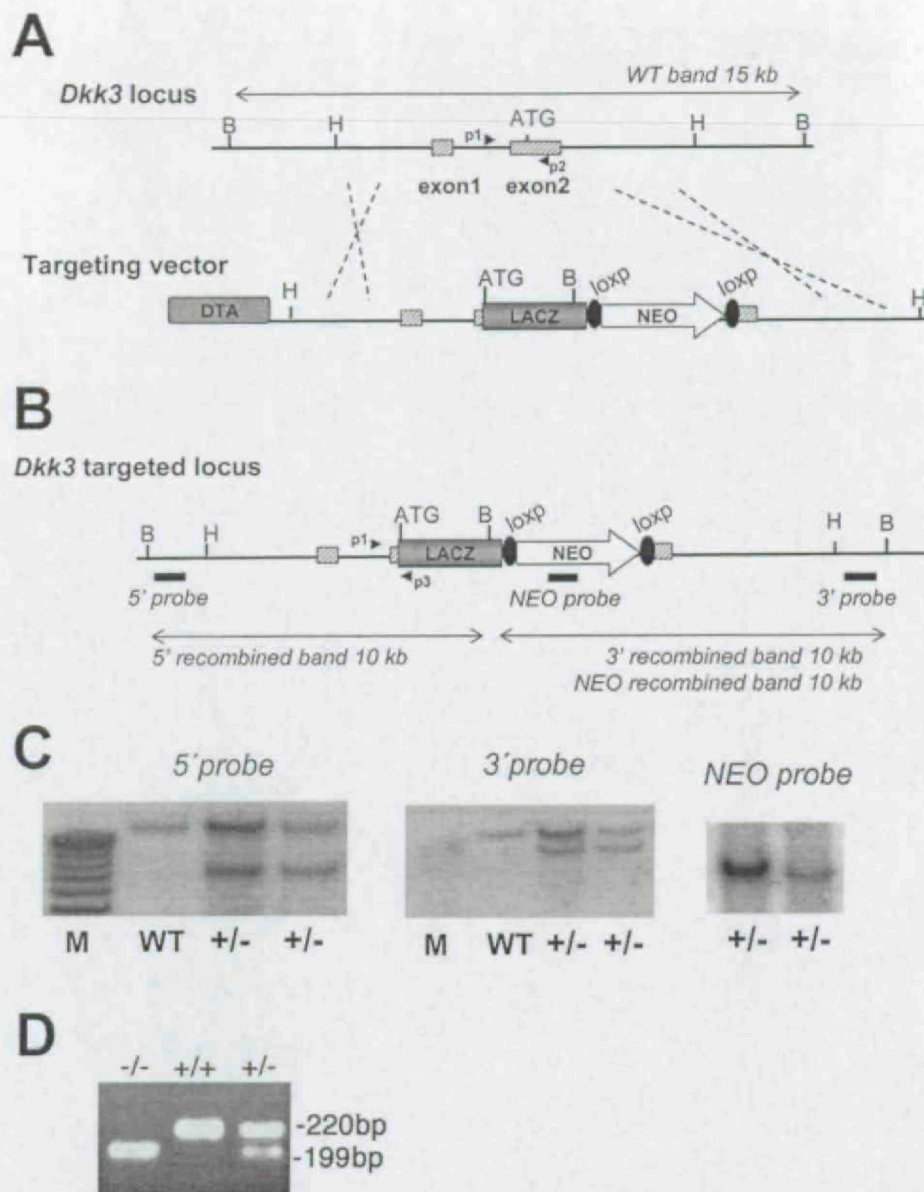


FIG. 1. Generation of *dkk3* mutant mice. (A) Schematic diagram of the *dkk3* locus and targeting construct. The construct contains 4 kb of the 5' and 3' *dkk3* genomic sequence. A *lacZ* reporter gene followed by a floxed PGKNEO (NEO) selection marker replaces most of the coding sequence in exon 2. A counterselection cassette encoding the A subunit of diphtheria toxin (DTA) was inserted at the 5' end of the vector. The wild-type band expected from a BamHI digestion is 15 kb. (B) Schematic diagram of the *dkk3* targeted allele. After homologous recombination in ES cells, the *lacZ* reporter gene is maintained in frame with the initial ATG. The probes and restriction enzymes are indicated, with the size of the resulting recombined restriction fragments. (C) Southern blot analysis after digestion with BamHI and hybridization with external 5' and 3' probes and internal NEO probe of two positive independent ES clones. (D) Triplex PCR of mouse genomic DNA from *dkk3*^{-/-} mice (-/-), wild-type mice (+/+), and heterozygous mice (+/-). A single 199-bp fragment appears in the case of *dkk3*^{-/-} mice, a single 220-bp fragment appears in the case of wild-type mice, and both fragments appear in the case of heterozygous mice. Abbreviations: H, HindIII; B, BamHI; M, marker.

cRNA probes. A *dkk3*-specific probe spanning nucleotides 287 to 640 (404 bp, encompassing exons 2 to 6) from the mouse cDNA sequence (NM_015814) (33) was used. A specific rat *p29* probe (nucleotides 1172 to 1499, 328 bp; AF245040) and specific *D2* probe (nucleotides 535 to 901, 366 bp; U53505) were used as previously described (15, 34). The sense and antisense riboprobes for *in situ* hybridization were synthesized with suitable RNA polymerase (SP6 or T7) in the presence of ³⁵S-labeled UTP (NEN Life Science Products) by *in vitro* transcription.

In situ hybridization histochemistry. Mice were fixed by transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde-0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Cryoprotected brains were frozen in dry ice, and 25-μm-thick sections were obtained with a cryostat.

The detection of *p29*, *D2*, and *dkk3* mRNAs with ³⁵S-labeled riboprobes was performed with free-floating sections according to protocols previously described in detail (3). Due to the floating procedure, there are structures such as the leptomeninges and choroid plexus that were not well preserved in all sections. Briefly, the sections were pretreated in different solutions for 10 min at room temperature; each section was permeabilized with 0.05% Triton X-100 in PBS, deproteinized with 0.2 N HCl, acetylated with 0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine buffer (pH 8.0), postfixed in fixative, and washed in PBS. Hybridization was performed at 55°C for 16 h, with the ³⁵S-labeled riboprobe at 1.6 × 10⁷ cpm/ml. The sections were mounted on coated slides, dehydrated, air

TABLE 1. Results of GMC behavior screen^a

Parameter	Control (A)			Mutant (B)			A-B (P value)	
	Male (n = 11)	Female (n = 15)	P value	Male (n = 7)	Female (n = 15)	P value	Male	Female
Behavioral observation in the modified hole board test								
Line crossing (frequency)	76.82 ± 4.36	94.73 ± 5.33	NA	92.57 ± 6.65	114.20 ± 7.29	NA	NS	0.05
Rearings in box (frequency)	22.64 ± 1.82	31.40 ± 2.67	NA	25.43 ± 3.36	31.00 ± 2.97	NA	NS	NS
Hole exploration (frequency)	14.45 ± 2.45	6.00 ± 1.12	NA	11.71 ± 2.49	9.60 ± 1.60	NA	NS	NS
Board entry (frequency)	3.91 ± 1.07	1.80 ± 0.56	NA	4.29 ± 1.38	2.67 ± 0.65	NA	NS	NS
Board entry (latency)	155.43 ± 25.85	208.31 ± 23.46	NA	175.03 ± 35.64	193.08 ± 23.08	NA	NS	NS
Board entry (% total duration)	7.45 ± 1.57	2.30 ± 0.82	NA	6.04 ± 1.65	4.46 ± 1.06	NA	NS	NS
Rearing on board (frequency)	0.36 ± 0.28	0.27 ± 0.15	NA	0.43 ± 0.43	0.80 ± 0.24	NA	NS	NS
Grooming (frequency)	2.09 ± 0.49	1.80 ± 0.33	NA	1.71 ± 0.29	1.07 ± 0.25	NA	NS	NS
Video tracking of locomotor behavior								
Distance moved (cm)	2,173.83 ± 143.27	2,488.09 ± 115.50	NA	2,209.48 ± 194.12	2,958.40 ± 169.14	NA	NS	0.05
Mean velocity (cm/s)	14.68 ± 0.54	16.37 ± 0.53	NA	14.22 ± 1.17	17.96 ± 0.70	NA	NS	NS
Maximum velocity (cm/s)	60.04 ± 6.95	54.74 ± 2.48	NA	54.22 ± 6.61	64.09 ± 4.07	NA	NS	0.05
Turns (frequency)	1,331.18 ± 70.41	1,447.0 ± 49.24	NA	1,331.19 ± 108.57	1,626.50 ± 61.18	NA	NS	<0.05

^a Data are from 9-week-old mice and are shown as means ± SEM. NA, not analyzed; NS, not significant.

dried, and exposed to Biomax MR film (Eastman Kodak, Rochester, NY) for 10 days for *dkk3* and *p29* expression analysis and for 2 weeks for D2 studies. For cellular resolution, the sections were dipped in Hypercoat LM-1 photographic emulsion (Amersham Pharmacia Biotech), exposed for 20 to 40 days in the cold, developed, fixed, counterstained with Richardson's blue, and dehydrated, and coverslips were applied.

The autoradiographic films were scanned with a Coolscan II slide scanner (Nikon Corp., Tokyo, Japan) at a resolution of 400 pixels/inch and printed. Optical observations and photographs were carried out with an Eclipse E400 microscope and Dn100 digital camera (both, Nikon Corp., Tokyo, Japan). For the identification of brain structures, the atlas of Paxinos and Franklin (42) was followed.

Deiodinase activities. Tissues were homogenized in buffer (0.32 M sucrose, 10 mM HEPES, 10 mM dithiothreitol [DTT]; 1 mM DTT for liver and kidney), pH 7.0). Before each assay, ¹²⁵I-labeled T4 or ¹²⁵I-labeled reverse T3 (rT3) was purified from the iodide traces. The amount of iodide in the blanks was <0.5 to 1% of the total radioactivity. D2 activity was determined for tissue homogenates as previously described (39) using ¹²⁵I-labeled T4, 2 nM T4, 1 μM T3, 20 mM DTT, and 1 mM propylthiouracil. Results are expressed in femtomoles per hour per milligram of protein. Detection limits were 2 to 3 fmols/h · mg of protein. D2 activity was also assayed in the neocortex and cerebellum with ¹²⁵I-labeled rT3 as a substrate (2 nM); similar results were obtained (not shown). D1 activity in liver and kidney homogenates was assayed (44) using ¹²⁵I-labeled rT3, 400 nM rT3, and 2 mM DTT. Results are expressed in picomoles per hour per milligram of protein. Pituitary D1 and D2 activity was assayed with ¹²⁵I-labeled rT3, 2 nM rT3, and 20 mM DTT in the presence or absence of 1 mM propylthiouracil (for D2 and total deiodinase activity, respectively). Results are given in femtomoles per hour per milligram of protein.

T4 and T3 determination in tissues. Thyroid hormones were determined by radioimmunoassays (RIAs) after extraction and purification of plasma and tissues (35, 38). Frozen tissue samples were homogenized in methanol with tracer amounts of ¹³¹I-labeled T4 and ¹²⁵I-labeled T3, added to each homogenate. The iodothyronines were extracted by chloroform-methanol (2:1), back extracted into an aqueous phase, and purified through Bio-Rad AG 1X2 resin columns. The

purified iodothyronines were then evaporated to dryness and dissolved in RIA buffer. Each extract was counted to determine the recovery of the ¹³¹I-labeled T4 and ¹²⁵I-labeled T3 in each sample. The samples are submitted to RIAs for the determination of T4 and T3, the limits of sensitivity being 2.5 pg T4 and 1.5 pg T3. Each sample was processed in duplicate at 2 dilutions. Concentrations were calculated using the amounts of T4 and T3 found in the RIAs, the individual recovery of the ¹³¹I-labeled T4 and ¹²⁵I-labeled T3 added to each sample, and the weight of the tissue sample extracted.

High-specific-activity ¹³¹I-labeled T4, ¹²⁵I-labeled T3, ¹²⁵I-labeled T4, and ¹²⁵I-labeled rT3 (3,000 μCi/μg) were synthesized in our laboratory as previously described (35) and used for the highly sensitive T4 and T3 RIAs as recovery tracers for plasma and tissue extractions and as substrates for D1 and D2 deiodinases.

Data are presented as mean values (±SEM). One-way analysis of variance was applied after ensuring homogeneity of variance by Bartlett's test. Statistically significant differences between mean values of different groups were then identified by the least-significant-difference method. All calculations were performed as previously described (49).

RESULTS AND DISCUSSION

Generation of *dkk3* mutant mice. A targeting vector was designed to constitutively disrupt *dkk3* exon 2, containing the signal sequence, by insertion of a *lacZ neo* cassette (Fig. 1). A homologous recombinant ES clone was generated and used to derive chimeras which gave rise to *dkk3*^{+/-} pups. Intercrossing of these heterozygous mice produced homozygous *dkk3*^{-/-} offspring, which were viable and fertile and obtained at the expected Mendelian ratio. *dkk3*^{-/-} embryos and adults were examined by X-galactosidase staining but failed to produce any

TABLE 2. Results of the GMC hematological screen^a

Hematological parameter	Control (A)			Mutant (B)			A-B (P value)	
	Male (n = 14)	Female (n = 14)	P value	Male	Female	P value	Male	Female
White blood cell count (10 ³ /μl)	8.57 ± 0.78	5.61 ± 0.46	<0.01	7.87 ± 0.42	6.65 ± 0.52	NS	NS	NS
Red blood cell count (10 ⁶ /μl)	10.26 ± 0.16	10.07 ± 0.19	NS	10.27 ± 0.16	10.30 ± 0.14	NS	NS	NS
Hemoglobin (g/dl)	14.96 ± 0.25	15.21 ± 0.27	NS	15.62 ± 0.24	16.01 ± 0.19	NS	NS	<0.05
Hematocrit (%)	46 ± 0.79	45 ± 0.83	NS	50 ± 0.98	50 ± 0.74	NS	<0.01	<0.001
Mean corpuscular volume (fl)	44.79 ± 0.24	45.07 ± 0.25	NS	48.73 ± 0.33	48.80 ± 0.24	NS	<0.001	<0.001
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	14.52 ± 0.08	15.14 ± 0.08	<0.001	15.20 ± 0.09	15.57 ± 0.10	<0.02	<0.001	<0.01
Mean corpuscular hemoglobin concn (g/dl)	32.55 ± 0.12	33.56 ± 0.11	<0.001	31.20 ± 0.17	31.93 ± 0.18	<0.01	<0.001	<0.001
Platelet count (10 ³ /μl)	888 ± 37.81	654 ± 59.38	<0.01	854 ± 35.97	756 ± 32.82	NS	NS	NS

^a Data are from 12-week-old mice and are shown as means ± SEM. NS, not significant.

TABLE 3. Results of GMC lung function screen^a

Spontaneous breathing pattern during rest and activity	Control (A)			Mutant (B)			A~B (P value)	
	Male (n = 5)	Female (n = 4)	P value	Male (n = 5)	Female (n = 5)	P value	Male	Female
Rest								
Respiratory rate (f) (l/min)	348.0 ± 13.0	368.7 ± 21.4	NS	333.1 ± 10.1	376.0 ± 20.4	NS	NS	NS
Tidal volume (TV) (ml)	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	NS	0.26 ± 0.01	0.22 ± 0.01	NS	NS	<0.01
Specific tidal volume (sTV) (μl/g)	9.1 ± 0.6	11.9 ± 0.5	<0.02	8.6 ± 0.2	9.8 ± 0.6	NS	NS	<0.05
Minute ventilation (MV) (ml/min)	99.6 ± 3.6	104.6 ± 6.6	NS	83.3 ± 3.0	84.0 ± 6.0	NS	<0.01	NS
Specific minute ventilation (sMV) (ml/g)	3.1 ± 0.2	4.3 ± 0.3	<0.02	2.8 ± 0.1	3.6 ± 0.4	NS	NS	NS
Inspiratory time (Ti) (ms)	64.5 ± 2.8	53.3 ± 3.1	<0.05	61.7 ± 3.0	50.6 ± 1.8	<0.02	NS	NS
Expiratory time (Te) (ms)	108.9 ± 4.5	110.9 ± 5.9	NS	119.0 ± 2.0	110.9 ± 7.0	NS	NS	NS
Fraction of respiration (Ti/TT)	0.37 ± 0.01	0.32 ± 0.01	<0.01	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.01	NS	NS	NS
Peak inspiratory rate (PIF) (ml/s)	7.6 ± 0.5	9.4 ± 0.5	NS	7.6 ± 0.3	8.2 ± 0.5	NS	NS	NS
Peak expiratory rate (PEF) (ml/s)	6.6 ± 0.4	6.5 ± 0.6	NS	6.2 ± 0.5	5.5 ± 0.4	NS	NS	NS
Mean inspiratory rate (MIF) (ml/s)	4.5 ± 0.3	5.4 ± 0.2	NS	4.2 ± 0.2	4.5 ± 0.2	NS	NS	<0.05
Mean expiratory rate (MEF) (ml/s)	2.7 ± 0.08	2.6 ± 0.2	NS	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2	NS	<0.01	<0.05
Activity								
Respiratory rate (f) (l/min)	473.8 ± 6.9	506.5 ± 2.7	NS	472.6 ± 6.6	512.6 ± 11.0	<0.02	NS	NS
Tidal volume (TV) (ml)	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.02	NS	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.01	NS	<0.02	<0.05
Specific tidal volume (sTV) (μl/g)	9.7 ± 0.8	12.1 ± 0.7	NS	8.6 ± 0.4	10.5 ± 0.8	NS	NS	NS
Minute ventilation (MV) (ml/min)	144.8 ± 5.2	147.7 ± 12.3	NS	119.5 ± 3.5	123.1 ± 7.3	NS	<0.01	NS
Specific minute ventilation (sMV) (ml/g)	4.5 ± 0.3	6.1 ± 0.5	<0.05	4.0 ± 0.2	5.3 ± 0.5	NS	NS	NS
Inspiratory time (Ti) (ms)	48.1 ± 0.9	43.9 ± 1.1	<0.02	45.3 ± 0.9	41.9 ± 0.4	<0.01	NS	NS
Expiratory time (Te) (ms)	78.6 ± 2.4	75.0 ± 3.4	NS	81.7 ± 1.1	75.4 ± 2.4	NS	NS	NS
Fraction of respiration (Ti/TT)	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.01	NS	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.01	NS	NS	NS
Peak inspiratory rate (PIF) (ml/s)	10.8 ± 0.7	11.4 ± 0.8	NS	10.0 ± 0.4	10.1 ± 0.5	NS	NS	NS
Peak expiratory rate (PEF) (ml/s)	9.4 ± 0.4	9.0 ± 1.1	NS	8.1 ± 0.6	7.5 ± 0.5	NS	NS	NS
Mean inspiratory rate (MIF) (ml/s)	6.5 ± 0.4	6.7 ± 0.4	NS	5.6 ± 0.2	5.8 ± 0.3	NS	NS	NS
Mean expiratory rate (MEF) (ml/s)	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.4	NS	3.1 ± 0.1	3.2 ± 0.2	NS	<0.001	NS

^a Data are from 14-week-old mice and are shown as means ± SEM. NS, not significant.

staining. Likewise, in situ hybridization for *dkk3* confirmed downregulation of expression in mutant mice (see below). *dkk3*^{-/-} mice had normal size and body weight and overall were in good general health (well-groomed coat and normal body posture and righting reflex; not shown). A gross neurological examination of animals revealed no sign of modified sensory functions, as assessed by basic tests of vision, audition, olfaction, and touch sensitivity. No enhanced tumorigenesis or major reduction in life span was observed.

Phenotypic analysis in the GMC. *dkk3*^{-/-} mice were subjected to phenotypic analysis in the GMC, an open access platform for standardized phenotyping (11). Overall, several hundred parameters, including analysis of morphology, behav-

ior, neurology, vision and eye, clinical-chemical parameters, immunological status, nociception, lung function, and organ pathology were assessed. Four main significant differences between *dkk3* mutant mice and their wild-type littermates were observed, as described below.

Behavioral phenotype. A locomotor activity-related phenotype was observed with *dkk3*-deficient female mice (Table 1). *dkk3*^{-/-} females were hyperactive, which was reflected by an increased number of line crossings, increased distance moved, and an increased number of turns made within the observation period. Corresponding effects in males just missed statistical significance. *dkk3*^{-/-} females also reached a higher maximum velocity while exploring the arena, and additionally there was a

TABLE 4. Results of GMC immunology screen^a

Parameter	Control (A)			Mutant (B)			A~B (P value)	
	Male (n = 13)	Female (n = 14)	P value	Male (n = 12)	Female (n = 15)	P value	Male	Female
CD19 ⁺	39.6 ± 3.4	45.0 ± 2.7	NS	46.4 ± 3.0	44.5 ± 1.0	NS	NS	NS
CD19 ⁺ CD5 ⁻	97.8 ± 0.2	94.1 ± 0.4	<0.001	98.0 ± 0.3	94.0 ± 0.5	<0.001	NS	NS
CD19 ⁺ CD5 ⁺	2.2 ± 0.2	5.6 ± 0.3	<0.001	2.0 ± 0.3	5.7 ± 0.5	<0.001	NS	NS
CD3 ⁺	21.8 ± 2.3	29.9 ± 2.7	<0.05	21.7 ± 1.2	30.4 ± 1.6	<0.01	NS	NS
γδ TCR ⁺	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.03	<0.001	0.3 ± 0.02	0.2 ± 0.04	NS	NS	NS
Gr-1 ⁺	39.9 ± 5.3	19.6 ± 1.7	<0.01	33.5 ± 5.4	18.8 ± 1.1	NS	NS	NS
CD49b ⁺	26.8 ± 2.4	27.2 ± 2.6	NS	23.1 ± 1.9	34.2 ± 2.1	<0.001	NS	<0.05
CD4 ⁺	11.7 ± 1.1	17.1 ± 1.2	<0.01	11.7 ± 1.0	17.8 ± 1.3	<0.01	NS	NS
CD8β ⁺	8.3 ± 0.8	11.4 ± 0.5	<0.01	8.2 ± 0.7	12.8 ± 0.7	<0.001	NS	NS
IgG1	113.5 ± 24.3	315.4 ± 20.9	<0.001	208.7 ± 45.5	517.3	NS	NS	NS
IgG2a	178.8 ± 18.8	154.8 ± 8.3	NS	224.8 ± 24.8	158.0 ± 6.1	<0.01	NS	NS
IgG2b	286.9 ± 60.2	NA	NA	280.2 ± 68.4	NA	NA	NS	NA
IgG3	293.3 ± 79.0	1199.3 ± 266.9	<0.001	268.7 ± 57.0	1159.9 ± 354.3	<0.001	NS	NS
IgM	306.6 ± 40.9	388 ± 58.8	NS	604.1 ± 95.4	717.9 ± 103.7	NS	<0.01	<0.01
IgA	98.8 ± 16.7	178.1 ± 36.6	NS	134.1 ± 16.3	132.7 ± 17.0	NS	NS	NS

^a Data are from 12-week-old mice, presented as means ± SEM. NS, not significant; NA, not analyzed.

TABLE 5. *dkk3* and *p29* mRNA levels in mouse brain at postnatal day 11^a

Region	Mouse <i>dkk3</i>		Rat <i>p29</i>	
	WT	<i>dkk3</i> ^{-/-}	WT	<i>dkk3</i> ^{-/-}
CA1-4	++++	++	++++	+
DG	+	+	+	+
Cingulate Cx	+++	+	+++	+
Retrosplenial Cx	++++	++	++++	+
Piriform Cx	+++	+	+++	+
Smt Cx I	±	—	—	—
Smt Cx II-III	±	—	—	—
Smt Cx IV-V	+	—	++	+
Smt Cx VI	++	+	++	±*
Lateral ventricles (both sides)	+++	—	++	—
Third ventricle	++++	—	++	—
Circumventricular organs	++++	—	++++	—
Cerebellum egl	—	—	—	—
Cerebellum Mol	—	—	—	—
Purkinje cell layer	++	—	++	—
Cerebellum igl	++	—	++	—
Choroid plexus	+	—	+	—
Leptomeninges	+	±	+	±
Olfact. epithelium	++	—	+	—
Ant. olfact. nucleus	+	—	+	±

^a Qualitative autoradiographic analysis. The maximum signal is considered as a very high signal (++++), and the rest in proportion to this: high (+++), moderate (++), low (+), either noise or very low labeling (not easy to confirm) (±), no signal (—). Abbreviations: I to VI, layers of the neocortex; CA1-4, Ammon's horn of the hippocampus; Cx, neocortex; DG, dentate gyrus; egl, external granular layer; igl, internal granular layer; Mol, molecular layer; Smt, somatosensory; * anterior-posterior expression differences; no expression in anterior levels, low in intermediate levels, and higher in sections containing the hippocampus.

trend toward increased mean velocity. This hyperactivity was also reflected in trends toward increased hole exploration, increased rearing on the board, and reduced grooming. There were no specific effects on anxiety-related (board entry) behavior.

Red blood cell phenotype. Red blood cells of *dkk3*^{-/-} mice showed a higher mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin (MCH) content but a reduced MCH concentration, compared to their littermate controls, resulting in an elevated hematocrit and total hemoglobin concentration in blood (Table 2).

Lung phenotype. While control and mutant mice breathed at similar respiratory rates, tidal volumes in mutants were smaller than those in control animals, both at rest and during activity (Table 3). As a result, minute ventilation was about 20% lower in mutant mice. Differences were less pronounced when body weight-specific ventilation was considered.

Immunological phenotype. *dkk3*^{-/-} mice showed a two-times-higher IgM level than littermate controls. We also detected a slight, but statistically significant increase in the frequency of natural killer (NK) cells (CD49b⁺) in *dkk3*^{-/-} females. No significant differences were found with regard to the other cell subsets and immunoglobulins included in the screen (Table 4).

Expression of *dkk3* and *p29* in wild-type and *dkk3* mutant mice. A truncated rat *Dkk3* (*p29*) was implicated as the thyroid hormone binding subunit of D2. To analyze the possibility that *p29* and *dkk3* display distinct expression patterns, e.g., due to alternative promoters, and that *p29* expression may be unaffected in *dkk3* mutants, we first compared the expression pattern of a mouse *dkk3* 5' probe with the expression pattern

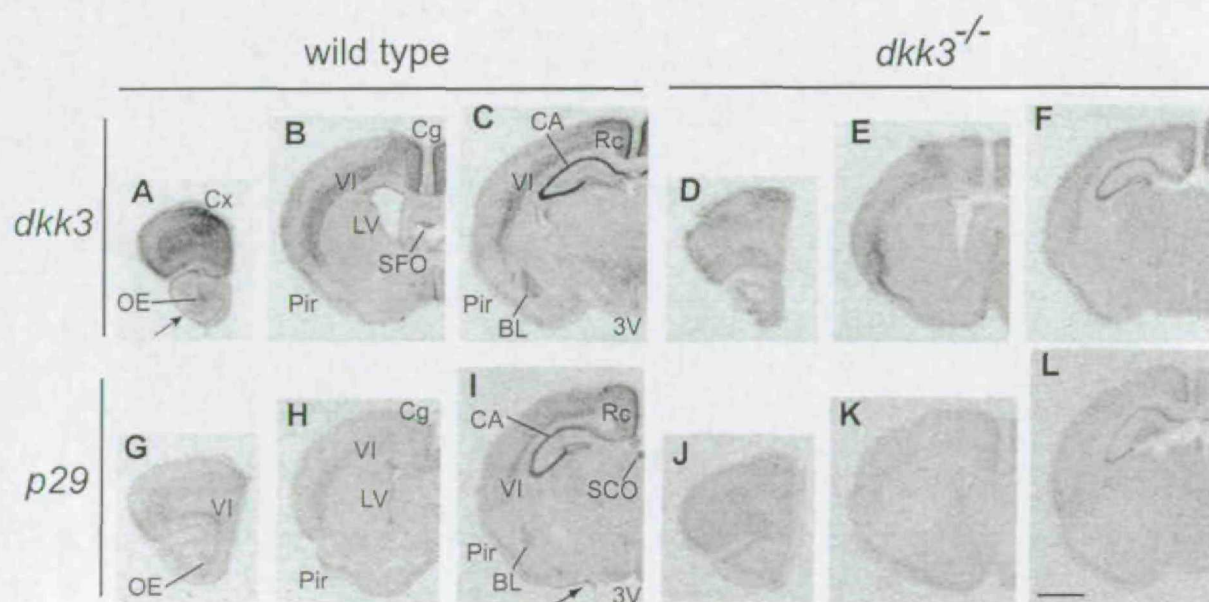


Figure 2

FIG. 2. Comparative regional expression of *dkk3* and *p29* mRNA in wild-type and *dkk3* mutant mice. Three representative autoradiographs of coronal sections organized from anterior to posterior levels are shown. Cx, neocortex; OE, olfactory epithelium; Pir, piriform cortex; VI, layer VI of the neocortex; Cg, cingulate cortex; LV, lateral ventricle; SFO, subfornical organ; Rc, retrosplenial cortex; CA, Ammon's horn of the hippocampus; BL, basolateral amygdaloid nucleus; 3V, third ventricle; SCO, subcommissural organ. The arrows (A and I) point to the meninges. Scale bar, 150 μ m.

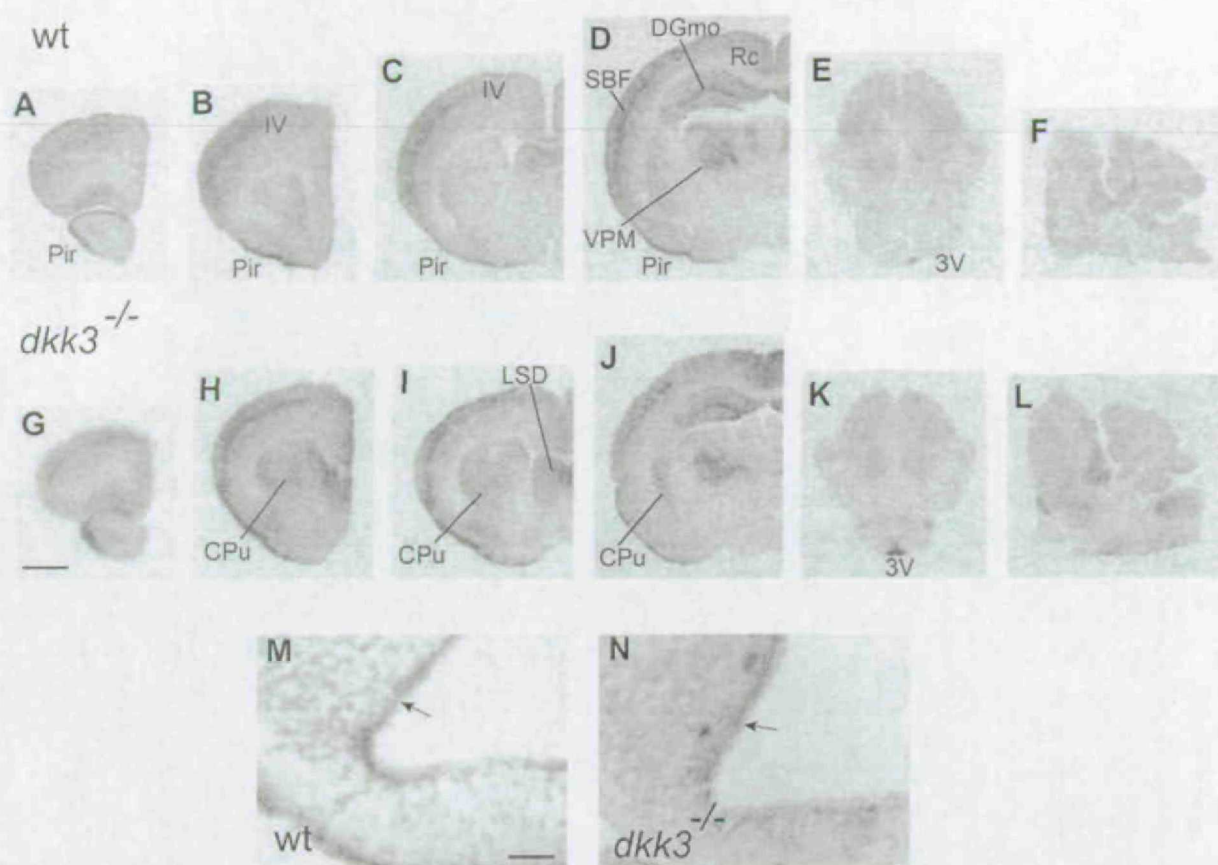


FIG. 3. *D2* expression in wild-type and *dkk3* mutant mice. (A to L) Regional expression of *D2* mRNA in wild-type (A to F) and mutant (G to L) mice. Representative coronal sections are organized from anterior to posterior levels. The cerebella were studied in sagittal sections. Pir, piriform cortex; IV, layer IV of the neocortex; SBF, barrel field of the somatosensory cortex; Rc, retrosplenial cortex; DGmo, molecular layer of the dentate gyrus; VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus; 3V, third ventricle; CPu, caudate-putamen; LSD, lateral septal nucleus, dorsal part. Scale bar, 150 μ m. (M and N) Micrographs showing the localization of *D2* mRNA in the tanycytes of the third ventricle of wild-type (M) and mutant (N) mice. Arrows point to black silver grains. Scale bar, 50 μ m.

representing bona fide rat *p29*. Rat *p29* has 87% similarity to mouse *dkk3* at the nucleotide level, and a *p29* probe can be used for in situ hybridization in mice (34). In wild-type animals, the distribution of the hybridization signal in brain slices obtained with the *p29*- and *dkk3*-specific probes was almost identical, although the *p29* probe gave weaker signals (Table 5), similar to the pattern of the same *p29* probe in rat brain (34). The most prominent signals for *dkk3* and *p29* were observed in the Ammon's horn of the hippocampus; cingulate, retrosplenial, and piriform cortices; and layer VI of the somatosensory cortex (Fig. 2A to C and G to I). There was also considerable expression in the internal granular layer and Purkinje cell layer of the cerebellum (not shown) and in the olfactory epithelium (Fig. 2A and G). In addition to expression in neuronal cells, *dkk3* was expressed in epithelial cells lining the lateral and third ventricles with a high hybridization signal in tanycytes (Table 5). Other important sites for communication with the cerebrospinal fluid (CSF) such as the choroid plexus and leptomeninges of the blood-cerebrospinal fluid barrier and the circumventricular organs also showed *dkk3* expression. Especially high levels of *dkk3* expression were found in the subfornical and subcommissural organs (Fig. 2B and I).

In *dkk3* mutants, hybridization signals for *dkk3* and *p29* were

very weak (Fig. 2D to F and J to L) and limited to the regions of the cerebral cortex, which also had the highest hybridization signal in wild-type mice (Fig. 2D to F).

Taken together, the common expression pattern of mouse *dkk3* and rat *p29*, as well as their common downregulation in *dkk3* mutants, supports the notion that *dkk3* and *p29* represent the same gene under a common promoter, both of which are inactivated in *dkk3* mutants.

Normal *D2* expression and activity in *dkk3* mutants. Expression and activity of *D2* in brain are homeostatically regulated by thyroid hormone status such that they increase in hypothyroidism and decrease in hyperthyroidism to maintain normal T3 concentrations (14, 27, 54). Therefore, we tested the possibility that *D2* expression was altered in *dkk3* mutant mice. The distribution of *D2* mRNA in the brains of wild-type mice was similar to that in *dkk3* mutants (Fig. 3A to L) and to that previously reported for rats (15). The hybridization signal was mainly localized in tanycytes lining the walls of the third ventricle and astrocytes in several brain regions (Fig. 3). There was only a slightly increased expression in the retrosplenial cortex and tanycytes of the third ventricle in *dkk3*^{-/-} mice (Fig. 3J and K).

To extend the results described above, *D2* enzyme activity in

TABLE 6. D2 and D1 activities in several organs of adult WT and *dkk3*^{-/-} mice^a

Mouse line	Organ			
	BAT D2	Neocortex D2	Cerebellum D2	Rest of brain D2
WT males	21.6 ± 2.4 (6)	30.6 ± 2.6 (7)	20.1 ± 3.6 (8)	18.4 ± 3.9 (5)
<i>dkk3</i> ^{-/-} males	30.1 ± 5.3 (6)	32.9 ± 1.1 (5)	30.7 ± 1.6 (7) ^b	15.5 ± 3.4 (3)
WT females	32.0 ± 3.6 (8) ^c	38.6 ± 1.7 (9) ^c	23.8 ± 2.4 (9)	7.9 ± 3.8 (3) ^c
<i>dkk3</i> ^{-/-} females	28.5 ± 2.1 (11)	19.6 ± 1.8 (10) ^{b,c}	20.3 ± 2.5 (12) ^c	7.0 ± 1.4 (4)
	Pituitary D1	Pituitary D2		
WT males	608 ± 99 (7)	315 ± 48 (8)		
<i>dkk3</i> ^{-/-} males	366 ± 44 (6) ^b	411 ± 55 (6)		
WT females	391 ± 58 (8) ^c	469 ± 28 (8) ^c		
<i>dkk3</i> ^{-/-} females	529 ± 47 (9)	570 ± 45 (12) ^c		
	Liver D1	Kidney D1		
WT males	6.23 ± 0.45 (7)	1.54 ± 0.08 (7)		
<i>dkk3</i> ^{-/-} males	4.60 ± 0.26 (5) ^b	1.67 ± 0.25 (7)		
WT females	5.24 ± 0.44 (8)	3.21 ± 0.09 (9) ^c		
<i>dkk3</i> ^{-/-} females	5.63 ± 0.40 (11)	3.19 ± 0.15 (10)		

^a D2 activities were determined using 2 nM T4 as substrate (results are expressed in femtomoles per hour per milligram of protein). For pituitaries D1 and D2, activities were determined by using 2 nM rT3 as substrate (in femtomoles per hour per milligram of protein). D1 activities in liver and kidney were determined by using 400 nM rT3 (picomoles per minute per milligram of protein). Data are means ± SEM. The number of animals used is indicated in parentheses.

^b *P* < 0.05, *dkk3*^{-/-} versus WT.

^c *P* < 0.05, males versus females.

different brain regions, in BAT, and pituitaries was determined. If *dkk3* was required for D2 deiodinase activity, a decrease in D2 enzymatic activity in *dkk3* mutants may be expected.

The results are summarized in Table 6. Males and females were analyzed separately, as sex-related differences were observed in some tissues. There were no differences in D2 activity between wild-type and *dkk3* mutant mice, except for a 50% decrease in the neocortex of *dkk3*^{-/-} females and a 50% increase in the cerebellum of *dkk3*^{-/-} males. No differences in D2 activity were observed in pituitaries. We also analyzed D1 activity, as it may compensate for loss of D2 activity, and generally found no major changes in *dkk3* mutants (Table 6). Only in mutant males was a decrease in D1 activity observed, in pituitary (by 40%) and liver (by 25%). We conclude that D1 and D2 activities are unaffected in most tissues in *dkk3* mutant mice.

***dkk3* mutants are euthyroid.** If a truncated rat Dkk3 (p29) was implicated as the thyroid hormone binding subunit of D2 enzyme, production of T3 should decrease in *dkk3* mutant

animals in those tissues in which T3 levels are dependent on the local T3 production via D2, such as brain and BAT (47, 48).

Therefore, T4 and T3 levels were measured in several tissues and in plasma of wild-type and *dkk3* mutant mice (Table 7). No changes were observed in most tissues studied. T3 was decreased in the kidney of *dkk3* mutant males (by 22%). T4 was elevated by 30% in the neocortex of *dkk3* mutant females and T3 (by 28%) in the liver of *dkk3* mutant females. These isolated changes in T4 and T3 concentrations are unlikely to be direct consequences of *dkk3* deletion. We conclude that no major changes in T3 concentrations are found and that most tissues of *dkk3* mutant mice remain euthyroid.

Conclusions. Our data indicate that *dkk3* is not essential for embryogenesis and viability, and they neither support a role in thyroid hormone metabolism nor indicate that p29 is a naturally occurring variant of physiological relevance.

Initial phenotyping reveals abnormalities in hematological and immunological parameters, lung ventilation, and behavior. In particular, the observed hyperactivity phenotype may be

TABLE 7. T4 and T3 concentrations in plasma and several organs of adult WT and *dkk3*^{-/-} mice^a

Concn (ng/g)	Organ						
	Plasma	BAT	Neocortex	Cerebellum	Rest of brain	Liver	Kidney
T4							
WT males	43.0 ± 2.7 (7)	6.33 ± 0.36 (8)	2.35 ± 0.15 (8)	18.75 ± 0.64 (6)	3.18 ± 0.16 (6)	31.5 ± 2.66 (6)	20.42 ± 1.11 (7)
<i>dkk3</i> ^{-/-} males	59.0 ± 7.9 (7)	6.04 ± 0.36 (6)	2.49 ± 0.32 (7)	15.85 ± 2.70 (6)	3.05 ± 0.30 (6)	28.17 ± 1.61 (7)	20.01 ± 3.41 (7)
WT females	46.8 ± 5.7 (6)	9.6 ± 0.66 (9) ^c	2.50 ± 0.12 (8)	14.51 ± 1.87 (9)	3.75 ± 0.35 (9)	28.7 ± 1.33 (8)	21.86 ± 1.16 (7)
<i>dkk3</i> ^{-/-} females	41.9 ± 5.8 (11) ^c	9.12 ± 0.60 (11) ^c	3.25 ± 0.17 (11) ^{b,c}	18.68 ± 2.09 (10)	3.35 ± 0.11 (11)	29.5 ± 1.13 (11)	22.23 ± 1.54 (11)
T3							
WT males	0.23 ± 0.02 (7)	2.00 ± 0.14 (8)	1.35 ± 0.21 (3)	2.74 ± 0.34 (7)	1.65 ± 0.07 (8)	2.75 ± 0.23 (6)	3.25 ± 0.11 (7)
<i>dkk3</i> ^{-/-} males	0.28 ± 0.03 (7)	1.71 ± 0.08 (6)	1.67 ± 0.18 (7)	2.66 ± 0.66 (6)	1.68 ± 0.10 (6)	3.23 ± 0.18 (7)	2.52 ± 0.24 (7) ^{b,c}
WT females	0.25 ± 0.01 (8)	2.97 ± 0.28 (9) ^c	1.34 ± 0.08 (8)	2.09 ± 0.18 (7)	1.82 ± 0.11 (9)	2.58 ± 0.15 (8)	3.15 ± 0.23 (9)
<i>dkk3</i> ^{-/-} females	0.24 ± 0.01 (11)	2.73 ± 0.18 (12) ^c	1.38 ± 0.10 (12)	2.99 ± 0.28 (8)	2.02 ± 0.12 (11) ^c	3.32 ± 0.23 (10) ^b	3.14 ± 0.13 (11)

^a Data are means ± SEM. The number of animals used is indicated in parentheses.

^b *P* < 0.05, *dkk3*^{-/-} versus WT.

^c *P* < 0.05, males versus females.

correlated with the expression of *dkk3* in dopaminergic neurons, abnormalities of which have been associated with alterations in locomotor activity. Recombinant Dkk3 promotes differentiation of dopaminergic neurons from undifferentiated precursors (E. Arenas, unpublished results), also hinting at a role for *dkk3* in this process.

Due to their distinct functions, a compensation of *dkk3* deficiency by other *dkk* genes appears unlikely; indeed, *dkk1/dkk3* double-mutant mice do not show any synthetic phenotypes (S. Pinho and C. Niehrs, unpublished data). However, combined inactivation of *dkk3* and the unique *dkk3*-related gene *soggy* (24) may reveal roles masked by redundancy.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sonia Pinho, Dana Hoppe, Socorro Duran, Maria Jesus Presas, Elena Fernandez-Duran, Maria Asuncion Navarro, and Marina Sanz-Sancristobal for excellent technical assistance and the screeners of the German Mouse Clinic for phenotypic analysis of the mice.

This work was supported by the DFG (SFB 488 A1), grants SAF2001-2243 and FIS RCMN 03/08 (M.-J.O.), BFI2001-2412 and BFU2004-05944 (A.G.-F.), NGFN 01GR0430, and 01GR0434, 01GR0458, and 01GR0103 (GMC).

REFERENCES

- Bafico, A., G. Liu, A. Yaniv, A. Gazit, and S. A. Aaronson. 2001. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3:683-686.
- Bernal, J. 2002. Action of thyroid hormone in brain. *J. Endocrinol. Invest.* 25:268-288.
- Bernal, J., and A. Guadaño-Ferraz. 2002. Analysis of thyroid hormone-dependent genes in the brain by in situ hybridization. *Methods Mol. Biol.* 202:71-90.
- Bianco, A. C., D. Salvatore, B. Gereben, M. J. Berry, and P. R. Larsen. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23:38-89.
- Chapman, S. C., R. Brown, L. Lees, G. C. Schoenwolf, and A. Lumsden. 2004. Expression analysis of chick Wnt and frizzled genes and selected inhibitors in early chick patterning. *Dev. Dyn.* 229:668-676.
- del Barco Barrantes, I., G. Davidson, H. J. Gröne, H. Westphal, and C. Niehrs. 2003. Dkk1 and noggin cooperate in mammalian head induction. *Genes Dev.* 17:2239-2344.
- Diep, D. B., N. Hoen, M. Backman, O. Machon, and S. Krauss. 2004. Characterisation of the Wnt antagonists and their response to conditionally activated Wnt signalling in the developing mouse forebrain. *Brain Res. Dev.* 153:261-270.
- Drorbaugh, J. E., and W. O. Fenn. 1955. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16:81-87.
- Fedders, H., R. Augustin, and T. C. Bosch. 2004. A Dickkopf-3-related gene is expressed in differentiating nematocytes in the basal metazoan Hydra. *Dev. Genes Evol.* 214:72-80.
- Fjeld, K., P. Kettunen, T. Furmanek, I. H. Kvinnsland, and K. Luukko. 2005. Dynamic expression of Wnt signaling-related Dickkopf1, -2, and -3 mRNAs in the developing mouse tooth. *Dev. Dyn.* 233:161-166.
- Gailus-Durner, V., H. Fuchs, L. Becker, L. Bolle, M. Brietmeier, J. Calzada-Wack, R. Elvert, N. Ehrhardt, C. Dalke, T. J. Franz, E. Grundner-Culemann, S. Hammelbacher, S. M. Holter, G. Holzwimmer, M. Horsch, A. Javaheri, S. V. Kalaydjiev, M. Klempt, E. Kling, S. Kunder, C. Lengger, T. Lisse, T. Mijalski, B. Naton, V. Pedersen, C. Prehn, G. Przemeck, I. Racz, C. Reinhard, P. Reitmeir, I. Schneider, A. Schrewe, R. Steinkamp, C. Zybille, J. Adamski, J. Beckers, H. Behrendt, J. Favar, J. Graw, G. Heldmaier, H. Hoffer, B. Ivandic, H. Katus, P. Kirchhof, M. Klingenspor, T. Klopstock, A. Lengeling, W. Muller, F. Ohl, M. Ollert, L. Quintanilla-Martinez, J. Schmidt, H. Schulz, E. Wolf, W. Wurst, A. Zimmer, D. H. Busch, and M. H. de Angelis. 2005. Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nat. Methods* 2:403-404.
- Glinka, A., W. Wu, H. Delius, A. P. Monaghan, C. Blumenstock, and C. Niehrs. 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391:357-362.
- Grotewold, L., T. Theil, and U. Ruther. 1999. Expression pattern of *dkk-1* during mouse limb development. *Mech. Dev.* 89:151-153.
- Guadaño-Ferraz, A., M. J. Escamez, E. Rausell, and J. Bernal. 1999. Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J. Neurosci.* 19:3430-3439.
- Guadaño-Ferraz, A., M. J. Obregon, D. L. St. Germain, and J. Bernal. 1997. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10391-10396.
- Guder, C., T. Nacak, S. Pinho, E. Hobmayer, C. Niehrs, and T. Holstein. An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in hydra. *Development*, in press.
- Hackam, A. S., R. Strom, D. Liu, J. Qian, C. Wang, D. Otterson, T. Gunatillaka, R. H. Farkas, I. Chowers, M. Kageyama, T. Leveillard, J. A. Sahel, P. A. Campochiaro, G. Parmigiani, and D. J. Zack. 2004. Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45:2929-2942.
- Hashimoto, H., M. Itoh, Y. Yamanaka, S. Yamashita, T. Shimizu, L. Solnica-Krezel, M. Hibi, and T. Hirano. 2000. Zebrafish Dkk1 functions in forebrain specification and axial mesoderm formation. *Dev. Biol.* 217:138-152.
- Hsieh, S. Y., P. S. Hsieh, C. T. Chiu, and W. Y. Chen. 2004. Dickkopf-3/REIC functions as a suppressor gene of tumor growth. *Oncogene* 23:9183-9189.
- Idkowiak, J., G. Weisheit, J. Plitzner, and C. Viebahn. 2004. Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. *Dev. Genes Evol.* 214:591-605.
- Kaplan, M. M., and K. A. Yaskoski. 1981. Maturation patterns of iodothyronine phenolic and tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum, and hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 67:1208-1214.
- Kazanskaya, O., A. Glinka, and C. Niehrs. 2000. The role of Xenopus dickkopf1 in prechordal plate specification and neural patterning. *Development* 127:4981-4992.
- Kobayashi, K., M. Ouchida, T. Tsuji, H. Hanafusa, M. Miyazaki, M. Namba, N. Shimizu, and K. Shimizu. 2002. Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in human tumor cells. *Gene* 282:151-158.
- Krupnik, V. E., J. D. Sharp, C. Jiang, K. Robison, T. W. Chickering, L. Amaravadi, D. E. Brown, D. Guyot, G. Mays, K. Leiby, B. Chang, T. Duong, A. D. Goodearl, D. P. Gearing, S. Y. Sokol, and S. A. McCarthy. 1999. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238:301-313.
- Kurose, K., M. Sakaguchi, Y. Nasu, S. Ebara, H. Kaku, R. Kariyama, Y. Arai, M. Miyazaki, T. Tsushima, M. Namba, H. Kumon, and N. H. Huh. 2004. Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J. Urol.* 171:1314-1318.
- Leonard, D. M., S. J. Stacherek, M. Safran, A. P. Farwell, T. F. Kowalik, and J. L. Leonard. 2000. Cloning, expression, and functional characterization of the substrate binding subunit of rat type II iodothyronine 5'-deiodinase. *J. Biol. Chem.* 275:25194-25201.
- Leonard, J. L., M. M. Kaplan, T. J. Visser, J. E. Silva, and P. R. Larsen. 1981. Cerebral cortex responds rapidly to thyroid hormones. *Science* 214:571-573.
- Li, X., P. Liu, W. Liu, P. Maye, J. Zhang, Y. Zhang, M. Hurley, C. Guo, A. Boskey, L. Sun, S. E. Harris, D. W. Rowe, H. Z. Ke, and D. Wu. 2005. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat. Genet.* 37:945-952.
- Mao, B., and C. Niehrs. 2003. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 302:179-183.
- Mao, B., W. Wu, G. Davidson, J. Marhold, M. Li, B. Mechler, H. Delius, D. Hoppe, P. Stannek, C. Walter, A. Glinka, and C. Niehrs. 2002. Kremen5 is novel Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417:664-667.
- Mao, B., W. Wu, Y. Li, D. Hoppe, P. Stannek, A. Glinka, and C. Niehrs. 2001. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411:321-325.
- Mao, J., J. Wang, B. Liu, W. Pan, G. H. Far III, C. Flynn, H. Yuan, S. Takada, D. Kimelman, L. Li, and D. Wu. 2001. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* 7:801-809.
- Monaghan, A. P., P. Kioschis, W. Wu, A. Zuniga, D. Bock, A. Poustka, H. Delius, and C. Niehrs. 1999. Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech. Dev.* 87:45-56.
- Montero-Pedrazuela, A., J. Bernal, and A. Guadaño-Ferraz. 2003. Divergent expression of type 2 deiodinase and the putative thyroxine-binding protein p29, in rat brain, suggests that they are functionally unrelated proteins. *Endocrinology* 144:1045-1052.
- Morreale de Escobar, G., R. Pastor, M. J. Obregon, and F. Escobar del Rey. 1985. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 117:1890-1900.
- Mukhopadhyay, M., S. Shtrom, C. Rodriguez-Esteban, L. Chen, T. Tsukui, L. Gomer, D. W. Dorward, A. Glinka, A. Grinberg, S. P. Huang, C. Niehrs, J. C. Belmonte, and H. Westphal. 2001. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Cell* 1:423-434.
- Nozaki, I., T. Tsuji, O. Iijima, Y. Ohmura, A. Andou, M. Miyazaki, N. Shimizu, and M. Namba. 2001. Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 19:117-121.
- Obregon, M. J., J. Mallo, F. Escobar del Rey, and G. Morreale de Escobar. 1981. Presence of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in tissues from thyroidectomized rats. *Endocrinology* 109:908-913.

39. Obregon, M. J., C. Ruiz de Ona, A. Hernandez, R. Calvo, F. Escobar del Rey, and G. Morreale de Escobar. 1989. Thyroid hormones and 5'-deiodinase in rat brown adipose tissue during fetal life. *Am. J. Physiol.* **257**:E625-E631.
40. Ohl, F., F. Holsboer, and R. Landgraf. 2001. The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.* **33**:392-397.
41. Ohl, F., I. Sillaber, E. Binder, M. E. Keck, and F. Holsboer. 2001. Differential analysis of behavior and diazepam-induced alterations in C57BL/6N and BALB/c mice using the modified hole board test. *J. Psychiatr. Res.* **35**:147-154.
42. Paxinos, G., and K. B. J. Franklin. 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, London, United Kingdom.
43. Roman-Gomez, J., A. Jimenez-Velasco, X. Agirre, J. A. Castillejo, G. Navarro, M. Barrios, E. J. Andreu, F. Prosper, A. Heiniger, and A. Torres. 2004. Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Cancer* **91**:707-713.
44. Ruiz de Ona, C., G. Morreale de Escobar, R. Calvo, F. Escobar del Rey, and M. J. Obregon. 1991. Thyroid hormones and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation: effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology* **128**:422-432.
45. Semenov, M. V., K. Tamai, B. K. Brott, M. Kuhl, S. Sokol, and X. He. 2001. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* **11**:951-961.
46. Shinya, M., C. Eschbach, M. Clark, H. Lehrach, and M. Furutani-Seiki. 2000. Zebrafish Dkk1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech. Dev.* **98**:3-17.
47. Silva, J. E., and P. R. Larsen. 1985. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J. Clin. Invest.* **76**:2296-2305.
48. Silva, J. E., and P. S. Matthews. 1984. Production rates and turnover of triiodothyronine in rat-developing cerebral cortex and cerebellum. Responses to hypothyroidism. *J. Clin. Invest.* **74**:1035-1049.
49. Snedecor, G. W., and W. G. Cochran. 1980. Statistical Methods, 7th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
50. Suwa, T., M. Chen, C. L. Hawks, and P. J. Hornsby. 2003. Zonal expression of dickkopf-3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex. *J. Endocrinol.* **178**:149-158.
51. Tankersley, C. G., R. S. Fitzgerald, R. C. Levitt, W. A. Mitzner, S. L. Ewart, and S. R. Kleeberger. 1997. Genetic control of differential baseline breathing pattern. *J. Appl. Physiol.* **82**:874-881.
52. Tsuji, T., M. Miyazaki, M. Sakaguchi, Y. Inoue, and M. Namba. 2000. A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**:20-24.
53. Tsuji, T., I. Nozaki, M. Miyazaki, M. Sakaguchi, H. Pu, Y. Hamazaki, O. Iijima, and M. Namba. 2001. Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant down-regulation in non-small-cell lung carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**:257-263.
54. Tu, H. M., S. W. Kim, D. Salvatore, T. Bartha, G. Legradi, P. R. Larsen, and R. M. Lechan. 1997. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* **138**:3359-3368.
55. Wu, W., A. Glinka, H. Delius, and C. Niehrs. 2000. Mutual antagonism between dickkopf1 and -2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Curr. Biol.* **10**:1611-1614.
56. Yamaguchi, Y., S. Itami, H. Watabe, K. Yasumoto, Z. A. Abdel-Malek, T. Kubo, F. Rouzaud, A. Tanemura, K. Yoshikawa, and V. J. Hearing. 2004. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J. Cell Biol.* **165**:275-285.

